

Aus dem Institut für Pathologie  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktorin: Frau Prof. Dr. Claudia Wickenhauser)

# Mutationsstatus des MDMX-Gens beim Ovarialkarzinom

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Nadja Ehrsam, geb. Sbrzesny  
geboren am 01.08.1984 in Berlin-Buch

Betreuer: Dr. rer. nat. F. Bartel  
Gutachter: Dr. rer. nat. F. Bartel  
Prof. Dr. med. Ch. Thomssen  
Prof. Dr. rer. nat. K. Römer (Homburg)

01.07.2014

23.06.2016

## Referat und bibliographische Beschreibung

Der Tumorentstehung liegen viele molekularbiologische Prozesse zugrunde, so auch beim Ovarialkarzinom. Eine wichtige Rolle hierbei scheint der p53-MDM2-MDMX-Pathway zu spielen.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, das Tumorgewebe eines umfangreichen Kollektivs von Ovarialkarzinompatientinnen auf den Mutationsstatus des MDMX-Gens hin zu untersuchen, um einen möglichen Zusammenhang bei der Tumorentstehung darzustellen.

Es wurden Tumorgewebeproben von 118 Patientinnen mit den dazugehörigen klinisch-pathologischen Daten für die Untersuchungen verwendet. Das in Paraffin eingebettete Material wurde zunächst mittels DNA-Isolation gewonnen, anschließend amplifiziert und dann sequenziert. Darauf folgte eine statistische Datenanalyse.

Es konnten 17 Mutationen im MDMX-Gen detektiert werden, wovon 4 bereits beschrieben wurden. Alle Mutationen fanden sich in Exon 11. Weiterhin konnten die bereits bekannten Einzelnukleotid-Polymorphismen SNP 31112 in Intron 9 und SNP 31274 in Intron 10 nachgewiesen werden. Auf die klinischen Daten bezogen, zeigte sich bei den SNPs, dass die genetischen Varianten des MDMX-Gens bei den Hormonrezeptor-negativen Tumoren einen Einfluss auf die Tumorentstehung und die Überlebenszeit bei den Ovarialkarzinompatientinnen haben.

Insgesamt konnte eine Mutationsrate des MDMX-Gens von 14 % bei den Ovarialkarzinompatientinnen festgestellt werden. Von den Veränderungen im MDMX-Gen scheint keine onkogene Wirkung auszugehen. Ein Zusammenhang ist in einzelnen Fällen allerdings nicht auszuschließen. Die beschriebenen SNPs jedoch haben eine prognostische Aussagekraft, was zu einer Optimierung der Therapieoptionen und der damit verbundenen Lebensqualität führen kann.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Das Ovarialkarzinom .....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Risikofaktoren.....	2
1.1.3 Symptome und Diagnose .....	3
1.1.4 Klassifikation.....	4
1.1.5 Therapie.....	5
1.1.6 Prognose .....	6
1.2 Molekulare Faktoren bei der Tumorentstehung .....	7
1.2.1 Das Tumorsuppressorgen p53 .....	8
1.2.2 MDM2.....	10
1.2.3 MDMX .....	11
1.3 Zielstellung.....	12
2. Material .....	13
2.1 Tumormaterial und Patientengut .....	13
2.2 Chemikalien und Reagenzien .....	15
2.3 Enzyme .....	15
2.4 Primer.....	16
2.5 Kits .....	17
2.6 Puffer und Lösungen .....	17
2.7 Angefertigte Puffer .....	17
2.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	18
3. Methoden.....	17
3.1 DNA-Isolation aus Paraffinmaterial nach Manos-Lahiri.....	17
3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	18
3.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	20
3.4 Reinigung des PCR-Produktes.....	20
3.5 Sequenzierreaktion .....	21
3.6 Statistische Auswertung .....	23

4. Ergebnisse.....	24
4.1 Sequenzierung des MDMX-Gens.....	24
4.2 SNP 31112 und SNP 31274 .....	32
4.2.1 SNP 31112 im Intron 9 .....	33
4.2.2 SNP 31247 im Intron 10 .....	36
5. Diskussion .....	39
6. Zusammenfassung .....	44
7. Literaturverzeichnis.....	45
8. Tabellenanhang .....	53
9. Thesen .....	54

# Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat(e)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Östrogenrezeptor
et al.	et altera
evtl.	eventuell
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
kDa	kilo Dalton
KCl	Kaliumchlorid
L	Liter
mA	Milliampere
MDM	Murines double minutes
mg	Milligramm
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
M	Mol

MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mM	Millimol
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
RING	Really interesting new gene domain
rpm	Umdrehungen/min
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
U	Unit
UICC	Union for International Cancer Control
UV	ultraviolett
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vgl.	Vergleich
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Ovarialkarzinom

Die flach-ovoid geformten paarigen Ovarien der geschlechtsreifen Frau liegen retroperitoneal im kleinen Becken zwischen Harnblase und Rektum. Sie besitzen endokrine und reproduktive Funktionen und ermöglichen durch die Follikelreifung und Ovulation die Bereitstellung befruchtungsfähiger Eizellen. Das Ovarialkarzinom stellt eine maligne Entartung des Ovars dar (Pfisterer und du Bois, 2002).

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom ist der sechshäufigste maligne Tumor der Frau und hat unter den gynäkologischen Krebserkrankungen nach dem Mammakarzinom die zweithöchste Sterblichkeitsrate. Im Jahr 2008 erkrankten in Deutschland 7.790 Frauen neu am Ovarialkarzinom (AGO; S3-Leitlinie 2013). Weltweit wurde 2008 bei 225.500 Frauen ein Ovarialkarzinom diagnostiziert, zum Tode führte diese Erkrankung bei 141.452 Frauen (ACS Global Cancer Facts and Figures 2013).

Hohe Inzidenzraten finden sich in den Industriestaaten Skandinaviens, Westeuropas und in den USA. Frauen in Entwicklungsländern und Japan sind am wenigsten betroffen (Riman *et al.*, 1998; Holschneider und Berek, 2000). Der Altersgipfel der Erkrankten liegt zwischen 50 und 60 Jahren. Aufgrund der Abwesenheit von Symptomen im Frühstadium, des Fehlens von diagnostizierbaren Läsionen des Ovarialepithels und des Mangels an spezifischen und sensitiven Screeningverfahren werden mehr als 75 % der Patientinnen mit Ovarialkarzinom bis heute erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (Nahas *et al.*, 1997; AGO; S3-Leitlinie Maligner Ovarialtumore 2013).

Trotz der Entwicklung eines umfangreichen operativen Therapiekonzeptes, einer modernen medikamentösen Therapie sowie des Einsatzes eines monoklonalen Antikörpers ist die Prognose beim Ovarialkarzinom insgesamt schlecht. Die 5-Jahresüberlebenszeit liegt derzeit bei ca. 40 % über alle Stadien (AGO; S3-Leitlinie Maligner Ovarialtumore 2013).

### 1.1.2 Risikofaktoren

Risikofaktoren für ein Ovarialkarzinom sind (Pfisterer und du Bois, 2002):

- eine belastende Familienanamnese

Etwa 5-10 % der Ovarialkarzinome sind erblich bedingt (Holschneider und Berek, 2000; Engel und Schubert-Fritschle, 2001). Die familiäre Häufung von Ovarialkarzinomen bezeichnet man als Ovarialkarzinom-Syndrom. Weiterhin gibt es Ovarialkarzinome, welche mit einem gehäuften Auftreten von Brustkrebs assoziiert sind ("hereditary breast ovarian cancer syndrome" HBOC; BRCA-1/-2 Trägerinnen), seltener auch mit dem Auftreten von Darm- und Gebärmutterkrebs ("hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome" HNPCC) oder anderen Tumoren (Li-Fraumeni-Syndrom) (AGO; S3-Leitlinie Maligner Ovarialtumore 2013). Mutationsträgerinnen des BRCA-1-Gens haben ein Lebenszeitrisiko von 40 %, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, Trägerinnen des mutierten BRCA-2-Gens von 25 % (Narod *et al.*, 2001). Bei gesunden BRCA-1- und BRCA-2-Mutationsträgerinnen führt nach abgeschlossener Familienplanung die prophylaktische beidseitige Salpingoovarektomie zu einer Risikoreduktion um 80 % bis > 90 % für ein Ovarialkarzinom (AGO; S3-Leitlinie Maligner Ovarialtumore 2013)

- zunehmendes Alter

Die "Ovulationshypothese" von Fathalla aus dem Jahr 1971 stellt einen Zusammenhang zwischen dem Ovarialkarzinom und wiederholter Ovulation her. Es wird davon ausgegangen, dass durch die Ovulationsprozesse im Oberflächenepithel geringe Traumen entstehen, welche dann im Rahmen von fehlerhaften Reparaturprozessen zur Entwicklung eines Karzinoms führen können. Das lässt vermuten, dass sich mit zunehmendem Alter, besonders bei früher Menarche und später Menopause, durch steigende Zykluszahl das Risiko erhöht. Dieser Zusammenhang konnte bisher jedoch noch nicht eindeutig festgestellt werden (AGO; S3-Leitlinie Maligner Ovarialtumore 2013).

Weiterhin wird hierbei deutlich, dass Gravidität, Stillen und orale Kontrazeptiva auf der anderen Seite protektive Faktoren darstellen. So konnten Studien zeigen, dass die Anwendung oraler Kontrazeptiva zu einer Senkung des Ovarialkarzinomrisikos von ca. 40 % führt (AGO; S3-Leitlinie Maligner Ovarialtumore 2013).

- endogene endokrine Risikofaktoren
  - Primäre Sterilität
  - Polyzystische Ovarien
- iatrogene endokrine Risikofaktoren
  - Sterilitätsbehandlung
  - Hormonersatztherapie in der Postmenopause
- Diätische Risikofaktoren (hoher Anteil an tierischen Fetten, hoher Fleischkonsum, Adipositas)
- Chronische Entzündungen
- Umweltfaktoren (Asbest, Talk-Puder, ionisierende Strahlen)

### **1.1.3 Symptome und Diagnose**

Die klinischen Symptome des Ovarialkarzinoms sind eher unspezifisch und treten erst spät im Krankheitsverlauf auf. Dies ist auf die Lage der Ovarien im kleinen Becken, welche ein unbemerktes Wachstum zulässt, zurückzuführen. Die Patientinnen können unregelmäßige Menstruationen sowie durch Verdrängung von Nachbarorganen bedingte Beschwerden zeigen (Bsp.: Pollakisurie, Obstipation, uncharakteristische Unterbauchbeschwerden). Im späteren Verlauf kann es u.a. auch zur Bildung von Aszites und damit zu einer Zunahme des Leibesumfanges kommen (Kristensen *et al.*, 1997).

Weitergehende Untersuchungen sollten durchgeführt werden, wenn ein Völlegefühl, Blähungen, unklare abdominelle Beschwerden oder eine Zunahme der Miktionsfrequenz wiederholt oder anhaltend auftreten, insbesondere bei Frauen über dem 50 Lebensjahr (AGO; S3-Leitlinie Maligner Ovarialtumore 2013).

Die Grundlage der Diagnostik stellt die vaginale Untersuchung zur Erhebung eines Tastbefundes dar (Kristensen *et al.*, 1997). Die Genauigkeit der bimanuellen Untersuchung wird hierbei durch verschiedene Faktoren, zum Beispiel anatomische Verhältnisse, Erfahrung des Untersuchers oder Abwehrspannung, beeinflusst (Scharf *et al.*, 2002). Unter den bildgebenden Verfahren hat die Transvaginalsonographie den höchsten Stellenwert. Die Dignität des Tumors wird hierbei nach folgenden Kriterien beurteilt (AGO; S3-Leitlinie Maligner Ovarialtumore 2013):

- Zystengröße
- Wanddicke
- Vorhandensein von Septen und soliden Anteilen

Die Computer-, Magnetresonanz- und Positronen-Emissions-Tomographie können bei speziellen Fragestellungen zur Ausdehnung als auch zur Differenzialdiagnostik eingesetzt werden (AGO; S3-Leitlinie Maligner Ovarialtumore 2013).

Der Tumormarker CA 125, ein hochmolekulares Glykoprotein, dessen Konzentration im Blutserum bestimmt wird, ist bei über 80 % der Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom erhöht (Jacobs *et al.*; 1990). Aufgrund seiner geringen Spezifität ist der Tumormarker jedoch nicht als Screeningverfahren geeignet (NIH (National Institutes of Health), 1994). Weiterhin konnte der routinemäßige Einsatz des Tumormarkers im Rahmen der Tumornachsorge zu keiner Verlängerung des Überlebens führen, weshalb die Markerbestimmung in der Nachsorge symptomfreier Patienten heutzutage nicht mehr empfohlen wird (AGO; S3-Leitlinie Maligner Ovarialtumore 2013).

#### **1.1.4 Klassifikation**

Aufgrund der unterschiedlichen Gewebe, die die Funktion des Ovars ermöglichen, werden nach der WHO-Klassifikation folgende Tumoren des Ovars unterschieden:

- epitheliale Tumoren
- Keimstrang- und Keimdrüsenstromatumoren
- Keimzelltumoren
- Tumoren des nichtspezialisierten Ovarialgewebes
- unklassifizierte Primärtumoren des Ovars
- Metastasierte Tumoren

Da bis zu 90 % der Ovarialkarzinome epitheliale Tumoren sind (Pfisterer 2002), wird sich im Folgenden auf diese Klasse beschränkt. Histologisch lassen sich die Epithelien der Tumoren durch die WHO (Scully *et al.*, 1999) in folgende Gruppen einteilen:

- seröses Epithel (46 %)
- muzinöses Epithel (36 %)
- endometroides Epithel (8 %)
- klarzelliges Epithel (3 %)
- gemischtes Epithel (3 %)
- Übergangsepithel (2 %)
- undifferenziertes Epithel (1 %)
- unklassifiziertes Epithel (1 %)

Die Hauptgruppe stellen hierbei die serösen Karzinome dar, welche früh metastasieren.

Das Grading des Ovarialkarzinoms sowie die Stadieneinteilung der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) erfolgen nach der Primäroperation und den Ergebnissen von histologischer und zytologischer Untersuchung.

Nach histopathologischem Grading unterscheiden sich die Tumore in (Shimizu, 1998):

- G1: hoch differenzierte Tumore
- G2: mäßig differenzierte Tumore
- G3: gering differenzierte oder undifferenzierte Tumore

Zur Beschreibung des Tumorstadiums werden die Stadieneinteilung nach FIGO und die pTNM-Klassifikation benutzt (UICC, 1997) (s. Tab. 10 im Anhang).

### **1.1.5 Therapie**

Im Vordergrund der Therapie steht die operative Entfernung des Ovarialtumors. Ein exaktes und systemisches, intraoperatives Staging sowie die vollständige Entfernung aller makroskopisch erkennbaren Tumormanifestationen sind hierbei wichtig für einen dauerhaften Therapieerfolg (Heintz *et al.*, 2003; Trimbos *et al.*, 2003). Als operativer Standard gelten die Längsschnittlaparotomie mit nachfolgender Extirpation von Uterus und Adnexe sowie eine infrakolische Omentektomie. Eine Ausnahme stellt hierbei die fertilitätserhaltende Operation bei einem sehr frühem Stadium von Ovarialkarzinomen dar (Pfisterer und du Bois, 2002).

Ein weiterer Eckpfeiler in der Therapie des Ovarialkarzinoms ist die adjuvante und neoadjuvante Chemotherapie. Alle Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom Stadium FIGO I-II, außer Stadium FIGO IA Grad 1, benötigen eine adjuvante Chemotherapie. Für das Stadium FIGO IB Grad 1 liegen zurzeit noch keine ausreichenden Daten vor, welche einen Nutzen dieser Therapie belegen (NIH, 1994; Morgan *et al.*, 1996; Kerbrat *et al.*, 2001). Eine medikamentöse Therapie kann hier, muss aber nicht erfolgen (AGO; S3-Leitlinie Maligner Ovarialtumore 2013). Als Standardtherapie beim frühen Ovarialkarzinom gilt eine platinhaltige Chemotherapie über 6 Zyklen (AGO; S3-Leitlinie

Maligner Ovarialtumore 2013). Da das Cisplatin eine hohe Toxizität aufweist (u.a. ototoxisch, neurotoxisch, nephrotoxisch), wurde dieses durch Carboplatin ersetzt und spielt in der heutigen Therapie kaum noch eine Rolle (Lutz *et al.*, 2001). Bei den fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen Stadium FIGO IIB-IV wird nach der operativen Therapie eine Chemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel über 6 Zyklen empfohlen. Weiterhin kann eine zusätzliche Behandlung mit Bevacizumab erfolgen. Studien konnten hier eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens nachweisen. Daten zum Gesamtüberleben gibt es jedoch noch nicht (AGO; S3-Leitlinie Maligner Ovarialtumore 2013).

Ein Problem bei der Chemotherapie stellt das Auftreten von Resistenzen dar. Diese werden meist durch die Zytostatikatherapie induziert oder treten bereits im Primärtumor auf. Oft zeigen auch Rezidive, die innerhalb von 6 Monaten nach der Primärtherapie auftreten, eine Resistenz gegenüber den Chemotherapeutika (Markman, 1998). In diesen Fällen erfolgt meist eine Monotherapie mit z.B. Topotecan oder Doxorubicin, welche jedoch oft nur geringe Wirkung bei den Patientinnen zeigt (AGO; S3-Leitlinie Maligner Ovarialtumore 2013).

### **1.1.6 Prognose**

Relevante Prognosefaktoren für das Überleben von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom sind das Tumorstadium, Alter, Allgemeinzustand und der postoperative Tumorrest. Der Tumorrest stellt hierbei den einzig beeinflussbaren Prognosefaktor dar. Patientinnen, die postoperativ keinen Resttumor aufweisen, haben die beste Prognose. Bei einem Resttumor < 1cm ist der Überlebensvorteil noch signifikant höher als bei einem Resttumor > 1 cm, verglichen mit der Komplettresektion jedoch insgesamt geringer (AGO; S3-Leitlinie Maligner Ovarialtumore 2013).

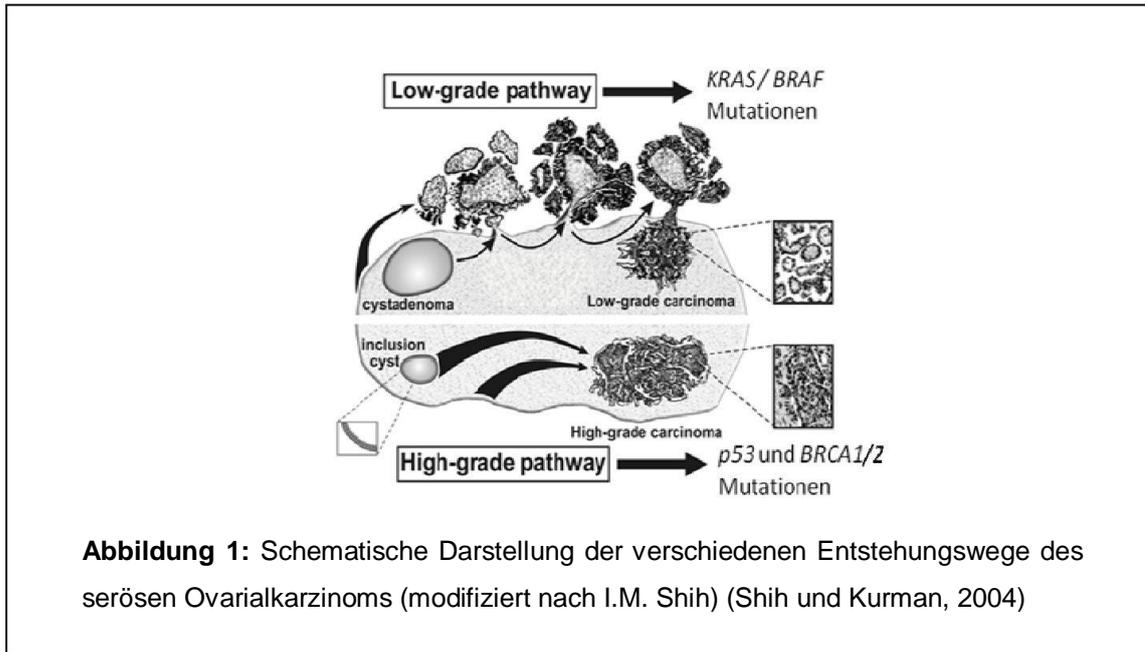
Bezüglich des Alters beträgt zum Beispiel die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) bei Frauen, welche jünger als 50 Jahre sind 76,6 %, bei Frauen im Alter von 50-69 Jahren 50,2 % und bei Frauen über 70 Jahren nur noch 31,6 % (Brown und Palmer, 2009). In Abhängigkeit vom Tumorstadium bei Erstdiagnose konnte nachgewiesen werden, dass die 5-JÜR im Stadium I bei 89,3 % liegt gegenüber Stadium IV mit gerade noch 17,9 % (Kosary *et al.*, 2007 Tab. 16.6). Obwohl das Alter in den meisten Studien unabhängig vom Tumorstadium prognostisch relevant ist, muss jedoch bedacht werden, dass jüngere Patientinnen meist eher Tumoren in niedrigen Tumorstadien aufweisen (Yancik *et al.*, 1993).

Weiterhin spielt der histologische Subtyp eine Rolle als prognostischer Parameter. Klarzellige und muzinöse Tumoren weisen hierbei eine ungünstigere Prognose auf als die endometrioiden und serös-papillären Tumoren (AGO; S3-Leitlinie Maligner Ovarialtumore 2013). Zudem sprechen die klarzelligen und muzinösen Tumore auch schlechter auf eine Therapie mit platinhaltigen Chemotherapeutika an (Silberberg, 1989; Hess *et al.*, 2003; Enomoto *et al.*, 2003).

Neben den klinischen Prognosefaktoren etablieren sich zunehmend molekularbiologische Faktoren. Die Bedeutung dieser Faktoren, wie z.B. der Her-2-Status, PAI (Plasminogenaktivator-Inhibitor), VEGF (vascular endothelial growth factor), p-53-Tumorsuppressorgen oder verschiedener Zytokine wurde in verschiedenen Studien untersucht. Hierzu fehlen jedoch weitere prospektive Studien um ihre Validität zu beurteilen (Sehouli *et al.*, 2004). Zum Beispiel konnte eine prognostische Aussagekraft in Bezug auf Genmutationen im p53-Gen, bcl-2-Gen und BAX-Gen in einzelnen retrospektiven und experimentellen Studien gezeigt werden, jedoch fehlen hierzu Untersuchungen an größeren Kollektiven, welche diese Ergebnisse bestätigen (Silvestrini *et al.*, 1998; Ziolowska-Seta *et al.*, 2009). Die Genomanalyse zur Vorhersage der Prognose oder des Therapieerfolges beim Ovarialkarzinom spielt daher in der Routinediagnostik bislang keine Rolle (AWMF Leitlinie maligner Ovarialtumore, 2007).

## 1.2 Molekulare Faktoren bei der Tumorentstehung

Molekularbiologisch lassen sich beim serösen Ovarialkarzinom zwei Entstehungswege unterschieden: der low-grade Pathway und der high-grade Pathway (Shih u. Kurmann, 2004). Bei den serösen low-grade Karzinomen handelt es sich um gut differenzierte Tumoren, die sich aus Borderline-Tumoren zu entwickeln scheinen. In über 60 % der serösen low-grade Ovarialkarzinome und der serösen Borderline Tumoren finden sich Mutationen im KRAS- oder BRAF-Gen, welche eine Onkogenaktivierung verursachen (Singer *et al.*, 2003). Dies führt zu einem langsamen Wachstum durch proliferative Stimuli, während die genomische Integrität erhalten bleibt.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der verschiedenen Entstehungswege des serösen Ovarialkarzinoms (modifiziert nach I.M. Shih) (Shih und Kurman, 2004)

Bei dem serösen high-grade Ovarialkarzinom handelt es sich um einen niedrig differenzierten Tumor, welcher *de novo*, d.h. ohne definierte oder bekannte Vorstufe, aus einer Einschlusszyste entsteht. Häufig zeigen diese high-grade Karzinome Mutationen der Tumorsuppressorgene p53 und BRCA-1/2 (Landen, Jr. *et al.*, 2008). Diese Mutationen führen zu einer genomischen Instabilität, welche sich in einem schnellen Wachstum mit vermehrten Kernatypien zeigt. Das p53-Gen scheint daher eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Ovarialkarzinoms einzunehmen, weshalb im Folgenden sowohl auf das p53-Gen als auch dessen regulierende Mechanismen eingegangen werden soll.

### 1.2.1 Das Tumorsuppressorgen p53

Das Tumorsuppressorgen p53 kodiert für das p53-Protein, welches als Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle in der Zellzykluskontrolle spielt. Es ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p13.1) lokalisiert und führt zur Bildung eines aus 393 Aminosäuren bestehenden Proteins mit einer Molekularmasse von 53 kDa, welche zur Namensgebung führte. Erstmals wurde das Protein 1979 beschrieben (Kress *et al.*, 1979; Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979). Es konnte festgestellt werden, dass Familien mit einer Keimbahnmutation des p53-Gens an einer Vielzahl verschiedener Tumore erkranken (Li-Fraumeni-Syndrom) (Malkin *et al.*, 1990). Bei normalen Wachstums- und Entwicklungsprozessen der Zelle liegt das p53-Protein nur

in geringen Konzentrationen vor. Seine Halbwertszeit beträgt maximal 20 Minuten. Es konnte nachgewiesen werden, dass p53-knock-out Mäuse sich normal entwickeln, jedoch sehr häufig Tumore bilden (Donehower *et al.*, 1992).

Die Aktivierung des p53-Gens erfolgt aufgrund einer Schädigung der DNA, beispielsweise durch UV-Strahlung, ionisierende Strahlung oder genotoxische Substanzen wie Chemotherapeutika. Es kommt dadurch zur Einleitung von Zellzyklusarrest, Apoptose, Seneszenz oder DNA-Reparaturmechanismen (Lane, 1992; Levine, 1997; Toledo und Wahl, 2006). Seine Hauptaufgabe liegt somit darin, die Anhäufung potentiell onkogener Mutationen zu verhindern und die genomische Integrität zu erhalten (Lane, 1992). Die wichtigsten wachstumsinhibierenden Mechanismen stellen hierbei der Zellzyklusarrest und die Apoptose dar. Durch seine Fähigkeit, das Wachstum potentieller Tumorzellen zu verhindern, ist das p53-Protein eines der wichtigsten Tumorsuppressoren. Es konnte gezeigt werden, dass in über 50 % der humanen Tumore das Tumorsuppressorgen p53 mutiert oder nicht vorhanden ist (Hollstein *et al.*, 1991; Toledo und Wahl, 2006).

Laut der Daten der „International Agency for Research on Cancer“ sind über 50 % der eingetragenen Mutationen des p53-Gens Missense-Mutationen. Hierbei handelt es sich um Punktmutationen, welche bei der Translation einen Austausch der Aminosäuren zur Folge hat. Die Missense-Mutationen des p53-Gens befinden sich überwiegend in der DNA-Bindungsdomäne, was zum Ausbleiben der Transkription von p53-induzierenden Genen führt (Hollstein *et al.*, 1991). Beim Ovarialkarzinom befinden sich die meisten Mutationen in Exon 5-8 des p53-Gens. Bei über 70 % der Mutationen handelt es sich um Transitionen (Purin/Purin Austausch; Pyrimidin/Pyrimidin Austausch). In immunhistochemischen sowie genetischen Expressions- und Mutationsstatusuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass in den fortgeschrittenen Tumorstadien (FIGO III/ IV) die Überexpression von mutiertem p53 (mut-p53) signifikant höher ist (Weham *et al.*, 2002). Weiterhin fiel auf, dass die Überexpression von mut-p53 an ein schlechteres Gesamtüberleben gekoppelt ist (Kappes *et al.*, 1995; Righetti *et al.*, 1996), jedoch ist die Bedeutung von p53-Mutationen für das Überleben noch nicht hinreichend untersucht.

### 1.2.2 MDM2

Das murine "double minutes" 2 Gen (MDM2) wurde ursprünglich aus der spontan transformierten Maus-Zelllinie 3T3-DM isoliert. Es liegt auf kleinen extrachromosomalen Kernkörperchen, die als „double minutes“ bezeichnet werden (Fakharzadeh *et al.* 1991). In humanen Zellen ist das Gen auf der Chromosomenregion 12q13-14 lokalisiert (Oliner *et al.* 1992).

Durch die Nutzung verschiedener Promotoren und durch alternatives Spleißen gibt es verschiedene Isoformen von MDM2 (Olson *et al.*, 1993; Haines *et al.*, 1994; Sigalas *et al.*, 1996). So konnte die Arbeitsgruppe um Sigalas sechs MDM2-mRNA-Varianten in Ovarial- und Urothelkarzinomen sowie in Leukämiezellen nachweisen (Sigalas *et al.*, 1996). Auch in Rhabdomyosarkomen zeigten sich drei alternative Transkripte (Bartel *et al.* 2001b). Insgesamt konnten in einer Vielzahl von Tumoren alternative Spleißvarianten von MDM2 detektiert werden (Kraus *et al.* 1999; Hori *et al.* 2000; Bartel *et al.* 2002). Hierbei zeigte sich in einigen Arbeiten, dass die Expression der verschiedenen Spleißvarianten mit einer schlechteren Prognose korreliert, andere Arbeiten jedoch konnten diesen Zusammenhang nicht aufweisen (Matsumoto *et al.* 1998; Bartel *et al.* 2001a; Lukas *et al.* 2001). Insgesamt besteht das Gen aus 12 Exonen, wobei das größte Transkript für ein 90 kDa großes Protein kodiert, welches sich aus 491 Aminosäuren zusammensetzt.

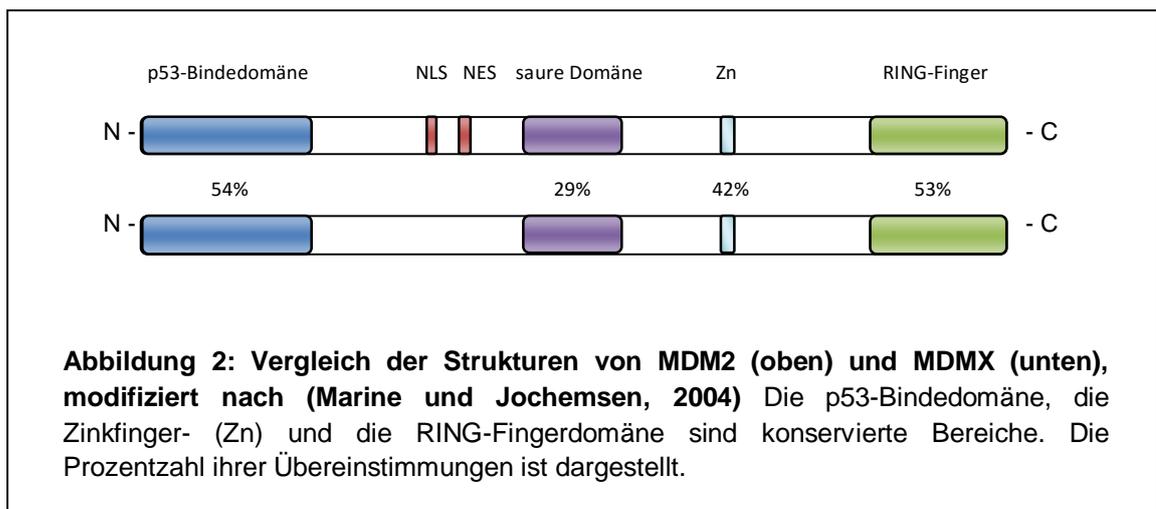
Es konnte gezeigt werden, dass ein MDM2 knock-out in Mäusen bereits embryonal letal ist, während MDM2/p53 double-knock-out Mäuse überleben, jedoch zu einer vermehrten Tumorbildung neigen (Rayburn *et al.* 2005). MDM2 kann durch die Bindung an p53 dessen transkriptionelle Funktion inhibieren (Momand *et al.* 1992). Außerdem fungiert MDM2 als E3-Ubiquitin-Ligase, indem es p53 ubiquitinyliert und somit für dessen proteasomalen Abbau markiert (Haupt *et al.* 1997). Die Expression von MDM2 wird durch den Tumorsuppressor p53 induziert, so dass diese beiden Produkte über einen autoregulatorischen „Feedback-Loop“ miteinander verbunden sind (Picksley und Lane, 1996). Weiterhin kann MDM2 sich selbst ubiquitinylieren und so seinen eigenen Abbau induzieren (Honda und Yasuda, 2000).

In einer Untersuchung von Bond und seinen Kollegen von 2004 konnte ein Einzelnukleotid-Polymorphismus SNP309 im P2-Promotor des MDM2-Gens nachgewiesen werden, welcher mit einer gesteigerten Expression von MDM2 und einer daraus folgenden abgeschwächten Effektivität des p53-Pathway einhergeht (Bond *et al.*, 2004). Außerdem stellt beim Ovarialkarzinom die Lokalisation des MDM2-Gens auf dem Chromosom eine Region dar, die oft Zugewinne aufweist (Hauptmann *et al.*,

2002). Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass MDM2-positive Tumore mit Chemoresistenzen und einem höheren Tumorstadium verbunden sind. Zudem ist das Gesamtüberleben von Patienten mit MDM2-positiven Tumoren signifikant niedriger als bei Patienten mit MDM2-negativen Tumoren (Dogan *et al.*, 2005).

### 1.2.3 MDMX

Das MDMX-Gen, auch MDM4 genannt, stellt ein weiteres Mitglied in der MDM-Familie („murines double minutes“) dar (Mancini *et al.*, 2009). Es ist auf dem Chromosom 1 in der Region 1q32 lokalisiert und kodiert für ein aus 490 Aminosäuren bestehendes und 80 kDa schweres Protein, welches eine hohe Ähnlichkeit zu MDM2 aufweist (Shvarts *et al.*, 1996, 1997). Die besonders gut konservierten Regionen sind in der N-terminalen p53-Bindungsdomäne und an der Zinkfinger- und RING-Fingerdomäne zu finden (Mancini *et al.*, 2009).



MDMX wird in nahezu allen Geweben exprimiert, jedoch in unterschiedlichen Mengen (Mancini *et al.*, 2009). Die mRNA enthält 11 Exone mit dem ersten Startcodon (AUG) im zweiten Exon. Trotz weiterer Startcodons an den Positionen 46, 53 und 61 (ausgehend vom ersten Startcodon) gibt es keinen Anhalt für alternative Proteine (Mancini *et al.*, 2009).

Wie MDM2 kann auch MDMX direkt an p53 binden und dessen transkriptionelle Aktivität inhibieren. Durch eine Stimulation der MDM2-E3-Ubiquitin-Ligase reguliert MDMX die Stabilität von p53 (Singh *et al.*, 2009; Linares *et al.*, 2003). Jedoch besitzt

MDMX selbst keine Ligaseaktivität wie MDM2 und kann somit p53 nicht für den Abbau in den Proteasomen markieren (Jackson und Berberich 2000). In Experimenten konnte gezeigt werden, dass ein MDMX-knock-out in Mäusen bereits embryonal letal ist und diese Wirkung durch ein zusätzlichen knock-out von p53 aufgehoben werden kann. Zudem konnte in einer großen Anzahl von humanen Tumoren eine erhöhte Expression von MDMX nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass eine MDMX-Haploinsuffizienz zu einer erhöhten p53-Aktivität und somit zu einer verminderten Tumorentstehung führt (Singh *et al.*, 2009). Diese Daten lassen vermuten, dass Veränderungen im MDMX-Gen p53 in seiner Funktion entscheidend beeinflussen können und somit auch eine wesentliche Rolle in der Tumorentstehung spielen könnten.

### **1.3 Zielstellung**

Durch zahlreiche Untersuchungen zum p53-Gen konnte dessen Stellung bei der Entstehung von Karzinomen und auch des Ovarialkarzinoms immer genauer definiert werden. Jedoch wurde auch deutlich, dass es sich hierbei um einen komplexen Vorgang handelt, bei welchem u.a. auch das MDM2- und MDMX-Gen eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Weder zu MDM2 noch zu MDMX gibt es derzeit ausreichende Untersuchungen zum Mutationsstatus. Deshalb war es Gegenstand dieser Doktorarbeit, alle kodierenden Exons des MDMX-Gens in Ovarialkarzinompatientenproben zu sequenzieren, um die Frage nach eventuellen Mutationen und damit verbundenen onkogenen Aktivitäten des Gens zu beantworten.

## 2. Material

### 2.1 Tumormaterial und Patientengut

Das Tumormaterial für diese Arbeit wurde aus 118 in Paraffin eingebetteten Ovariakarzinomen gewonnen. Die Fälle wurden zwischen 1997-2005 am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg diagnostiziert. Das Tumormaterial stammt überwiegend aus der Klinik für Gynäkologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Die folgenden klinischen Daten der Patientinnen wurden aus den Krankenakten erfasst:

- Alter der Patientinnen
- postoperativ verbliebener Tumorrest
- FIGO-Stadium
- adjuvante Chemotherapie
- Follow-up

Die klinisch-pathologischen Daten der Patientinnen werden im Detail in Tabelle 1 beschrieben.

Für die statistischen Untersuchungen wurden Kontrollproben von gesunden Personen zum Vergleich verwendet. Dieses Material wurde uns freundlicherweise durch das Institut für Humangenetik, das Institut für Rechtsmedizin, sowie das HLA-Labor der Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt. Im Mittel waren die Kontrollpersonen 41,9 Jahre alt (21-85 Jahre).

Sowohl von den Patientinnen als auch von den Kontrollpersonen lag das Einverständnis zur wissenschaftlichen Nutzung des Materials vor.

Tabelle 1: Klinisch-pathologische Daten der Ovaralkarzinompatientinnen (n=118)

<b>Charakteristika</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent</b>
<b><u>Tumor-Zelltyp</u></b>		
serös	67	56,8
muzinös	2	1,7
endometrioid	17	14,4
klarzellig	10	8,5
transitional	1	0,8
gemischt	13	11,0
undifferenziert	8	6,8
Gesamt	118	100,0
<b><u>Tumor-Stadium</u></b>		
FIGO I	35	29,7
FIGO II	10	8,5
FIGO III	66	55,9
FIGO IV	7	5,9
Gesamt	118	100,0
<b><u>Art der Therapie</u></b>		
Cisplatin + Paclitaxel	67	56,8
andere platinhaltige Chemotherapeutika	16	13,6
Monotherapie mit platinhaltigen Chemotherapeutika	5	4,2
andere	2	1,7
keine (FIGO Ia)	9	7,6
abgelehnt	6	5,1
tot	7	5,9
Daten fehlen	4	3,4
Gesamt	116	98,3
Fehlend im System	2	1,7
Gesamt	118	100,0
<b><u>Resttumor (n=96)</u></b>		
kein	32	33,3
ja	64	66,7

## 2.2 Chemikalien und Reagenzien

100 bp DNA Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Serva, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP)	Promega, Heidelberg
Ethanol (96 % p.a.)	Merck, Darmstadt
Ethanol (70 % p.a.)	Merk, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merk, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merk, Darmstadt
Natriumacetat	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid	Serva, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

## 2.3 Enzyme

HotStarTaq <sup>TM</sup> -DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ L)	Qiagen, Hilden
HotFirePol <sup>TM</sup> -DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	Solis, Estaland
Green Master Mix	Promega, Mannheim

## 2.4 Primer

Die für die PCR- und Sequenzierreaktionen verwendeten Primer wurde alle von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen und werden in der folgenden Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2: Verwendete Primer**

<b>Name</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>	<b>Orientierung</b>
XEx1fwd	CCTCgTgTgAggCCgTgTgg	sense
XEx1rev	ggCCgCCTgCTCCTCACTCT	antisense
XEx2fwd	gTTgCCTTTgTgTgAATgCTAA	sense
XEx2rev	ACAgTCATgAgACAgCTAAACT	antisense
XEx3fwd	TATCAggTACgACCAAACT	sense
XEx3rev	ATggCTTACCTCTTTAACAg	antisense
XEx4fwd	AgCggCTTTCCTgTTgTAgg	sense
XEx4rev	ggCTAggTATAAgCACCCAAA	antisense
XEx5fwd	TTTAACggCAAACCACTgAT	sense
XEx5rev	CCTTgAACTCAAAGCTgTgATA	antisense
XEx6fwd	gggTTgTTTgCTgAggTCCTT	sense
XEx6rev	gggAgTCCAAGATCCATAggT	antisense
XEx7fwd	CCCTggTCTCAgTTATTTCT	sense
XEx7rev	ggTTggAAgAggAAgAgAAC	antisense
XEx8fwd	AgCTCTgCCACTAAgACA	sense
XEx8fwd2	ACgTATTgTgCATAgTTATC	sense
XEx8rev	gCCACTTCCCTTCAAATgTg	antisense
XEx9fwd	gATgTAgTgTgACgACATTgAg	sense
XEx9rev	TgAgCACACAAACAgAATCAAC	antisense
XEx10fwd	gTgTTTggTCTTgCATTTAAgC	sense
XEx10rev	TgAACTgCTgggATTACATCA	antisense
XEx11_1fwd	ACTggTgTggAATAgCTTAgTg	sense
XEx11_1rev	ACgCATCTTTAggTCTAACgAC	antisense
XEx11_2fwd	CCTgATTgTCgAAgAACCACTT	sense
XEx11_2rev	ACATTCTCTgACAggTTggAAA	antisense
XEx11_3fwd	ggAggATTgCCAgAATCTCT	sense
XEx11_3rev	gAATAATgTTCCCgTCTCgT	antisense
Xp53RE fw	gTATATgTCCATCTCggTTT	sense
Xp53RE rev	gggATTTACCAAggTAAgTC	antisense

## 2.5 Kits

BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	ABI, Warrington, UK
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Seq lab PCR-Kombi-Kit	Seq lab, Göttingen

## 2.6 Puffer und Lösungen

Bindepuffer	Seq lab, Göttingen
DNA-Lösungspuffer	Tris-HCl 10 mM pH 7,6
EB – Puffer	Qiagen, Hilden
Elutions – Puffer	Seq lab, Göttingen
PBI – Puffer	Qiagen, Hilden
PE – Puffer	Qiagen, Hilden
Proteinase-K-Stammlösung	Qiagen, Hilden
QX 1 – Puffer	Qiagen, Hilden

## 2.7 Angefertigte Puffer

5x TBE – Puffer:	Tris-HCl 54,0 g Borsäure 27,5 g EDTA 20 mL 0,5 M pH 8,0 → mit Aqua bidest. auf 1 L auffüllen
Salzpuffer Lahiri	Tris-HCL 10mM pH 7,6 MgCl <sub>2</sub> 10 mM EDTA 2mM KCl 10 mM NaCl 0,4 mM

Verdaupuffer-Manos

Tris 50 mM pH 8,5

EDTA 1 mM

Tween 20 0,5 %

Aqua dest.

## 2.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien

10 ml / 50 ml Röhren

Greiner, Nürtingen

BiodocAnalyse

Biometra, Göttingen

Centrifuge 5804 R

Eppendorf, Hamburg

Gelkammer

BIOplex, Freiburg

Peltier Thermal Cycler PT200

MJ Research

Peltier Thermal Cycler Tetrad 2

BIO RAD, München

Pipettenspitzen 10 µL / 200 µL / 1000 µL

Greiner, Nürtingen

Plattenreader Genios

Tecan, Crailsheim

Reaktionsgefäße 0,2 mL / 0,5 mL / 1,5 mL / 2,0 mL

Eppendorf, Hamburg

Thermomixer compact

Eppendorf, Hamburg

TRIO – Thermoblock

Biometra, Göttingen

Universalzentrifuge 30 RF

Hettich, Tuttlingen

Vakuumpzentrifuge (Concentrator 5301)

Eppendorf, Hamburg

### 3. Methoden

#### 3.1 DNA-Isolation aus Paraffinmaterial nach Manos-Lahiri

Um die DNA aus dem Paraffinmaterial zu isolieren, wurden zunächst 5 µm dicke Schnitte, je nach Größe des Gewebes, in ein Reaktionsgefäß unter Zugabe von 1 ml Octan (Xylol) für 10 min geschüttelt und anschließend für 3-5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt wurde zweimal wiederholt, um das Paraffin vollständig zu lösen. Anschließend wurde zur Reinigung der Gewebeproben 1 ml 96-99 % Ethanol hinzugegeben, vermischt, zentrifugiert und abschließend abpipettiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Um das Pellet zu trocknen, wurde es für 5 min bei 45 °C in der Vakuumzentrifuge zentrifugiert.

Zum trockenen Pellet wurden dann 720 µl Verdauerpuffer-Manos sowie 80 µl Proteinase-K-Stammlösung (2mg/µl) hinzugegeben und der Ansatz über Nacht bei 37 °C im Thermomixer leicht geschüttelt.

Am Folgetag wurde der Ansatz für 8-10 min auf 95 °C im Thermomixer erwärmt, um die Proteinase zu inaktivieren. Nach dem Abkühlen des Ansatzes wurde dieser für 5 min bei 12000 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde mit dem Überstand durch Zugabe von 800 µl Salzpuffer Lahiri und 25 µl 20 % SDS weiter gearbeitet. Dieser Ansatz musste dann für 10 min auf 55 °C erhitzt werden und abschließend nach dem Abkühlen erneut für 5-10 min bei 12000 U/min bei 4 °C zentrifugiert werden.

Um die DNA zu fällen, wurde dem Überstand das gleiche Volumen Isopropanol hinzugegeben und der Ansatz nach gutem Vermischen über Nacht oder für mindestens 2 Stunden bei -20 °C ruhen gelassen. Im Anschluss wurde die Lösung für 20-30 min bei 15000 U/min bei 4 °C zentrifugiert, das Isopropanol abgegossen, das Pellet in der Vakuumzentrifuge für 5 min bei 45 °C getrocknet und anschließend in 50-100 µl DNA-Lösungspuffer aufgelöst.

Abschließend wurde die DNA-Konzentration durch Messung der Proben im Photometer bei 260 nm und 280 nm nach folgender Formel bestimmt:  $260 \text{ nm} \times 5000 = \text{Konzentration in ng/}\mu\text{l}$  ( $260:280 = \text{Reinheitsquotient R}$ ). Die gewonnene DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die gesamten für das Protein kodierenden Exons und ihre angrenzenden Bereiche des MDMX-Gens wurden mit Hilfe der PCR amplifiziert. Hierbei wurde unter Verwendung der in Tabelle 2 aufgeführten Primer die PCR durchgeführt. Die Komponenten für einen Ansatz von 50 µl sind in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: PCR-Reaktionsansatz mit der HotStarTaq™-DNA-Polymerase**

1 x Reaktionsansatz	
10 x Reaktionspuffer (mit 15mM MgCl <sub>2</sub> )	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	3 µl
dNTP's (2,5 mM)	4 µl
Q-Puffer 5 x	10 µl
Hotstar-Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
Primer (20 pmol/ µl), sense/ antisense je	1 µl
Aqua bidest.	26 µl

Zum Reaktionsmix wurde 1,5 µl (300 ng) der aus Paraffinmaterial gewonnenen DNA hinzugegeben. Die PCR erfolgte in einem der unter 2.7 genannten Thermocycler nach folgendem Programm:

Schritt 1:	95 °C	15 min	}	40 Zyklen
Schritt 2:	95 °C	10 s		
Schritt 3:	58 °C	20 s		
Schritt 4:	72 °C	20 s		
Schritt 5:	72 °C	5 min		
Schritt 6:	4 °C	∞		

Aufgrund der teils geschädigten DNA durch die Formalinfixierung konnte mit dieser Methode nicht immer eine Amplifikation des kompletten Exons erreicht werden. Besonders bei längeren Exonen (> 200 Basenpaaren) trat dieses Problem auf, so dass dadurch bei Exon 11 eine Amplifikation in drei Abschnitten mit den entsprechenden

Primern (s. Tabelle 2) notwendig war. Im Verlauf der Versuchsreihe wurden verschiedene Polymerasen und Reaktionsansätze sowie Reaktionsprogramme getestet, um bessere Ergebnisse bei der Amplifikation zu erzielen.

Die Versuchsreihe wurde zunächst mit der HotStarTaq™-DNA-Polymerase (5 U/μL) von Qiagen begonnen, jedoch gestaltete sich eine erfolgreiche Amplifikation der DNA bereits in Exon 2 zunehmend schwieriger, so dass testweise einige Proben mit der HotFirePol™-DNA-Polymerase (5 U/μl) von Solis amplifiziert wurden. Hierunter konnte ein besseres Ergebnis erzielt werden, so dass ab Exon 3 mit dieser Polymerase weitergearbeitet wurde.

Am Ende der kompletten Versuchsreihe gab es vereinzelt Proben, bei denen trotz mehrfach wiederholter PCR-Reaktionen auch mit der Fire-Polymerase keine Amplifikation bestimmter Exons erreicht werden konnte. Mit den betreffenden Exonen der Proben wurde abschließend eine PCR mit dem Green Master Mix von Promega durchgeführt. Aber auch hiermit konnten nicht alle fehlenden Exons amplifiziert werden, so dass die Proben, deren Exone nicht vollständig amplifiziert und somit auch nicht sequenziert werden konnten, aus dem Versuchsaufbau ausgeschlossen werden mussten.

Alle PCR-Reaktionen liefen in den unter 2.7 genannten Thermocyclern mit dem gleichen PCR-Programm (s.o.).

In den nachfolgenden Tabellen sind die Reaktionsansätze für die PCR mit der HotFirePol™-DNA-Polymerase (5 U/μl) und dem Green Master Mix dargestellt.

**Tabelle 4: PCR-Reaktionsansatz mit der HotFirePol™-DNA-Polymerase (5 U/μl)**

1 x Reaktionsansatz	
10 x Reaktionspuffer (mit 15mM MgCl <sub>2</sub> )	5 μl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5 μl
dNTP's (2,5 mM)	4 μl
HotFireTaq™-DNA-Polymerase (5 U/μl)	0,5 μl
Primer (20 pmol/ μl) je	1 μl
Aqua bidest	34,5 μl
DNA (300 ng)	1,5 μl

**Tabelle 5: PCR-Reaktionsansatz mit dem Green Master Mix**

1 x Reaktionsansatz	
Green Master Mix	25 μl
Primer (20 pmol/ μl) je	1 μl
Aqua bidest.	21,5 μl
DNA (300 ng)	1,5 μl

### 3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Der Nachweis einer erfolgreichen Amplifikation sowie die Isolation des PCR-Produktes erfolgten mittels Gelelektrophorese. Alle Elektrophoresen wurden in einem 1 %igen Agarosegel durchgeführt. Zur Herstellung des Gels wurde 1 g Agarose mit 100 ml 0,5 x TBE-Lösung gemischt und aufgekocht und nach kurzer Abkühlung mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt. Zum Nachweis der erfolgreichen Amplifikation wurden 5 µl des PCR-Produktes mit 1,5 µl Xylencyanol gemischt und zusammen mit einer Basenpaarleiter auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in 0,5 x TBE-Laufpuffer bei 90 V. Im Anschluss wurden die Banden mit Hilfe des Geldokumentationssystem BioDocAnalyse von Biometra unter UV-Licht ausgewertet und ausgeschnitten. Das Ausschneiden erfolgte mit einem sterilen Skalpell auf dem UV-Tisch, wobei darauf geachtet wurde, dass das Produkt nur für kurze Zeit dem UV-Licht ausgesetzt war, um DNA-Veränderungen zu vermeiden. Im Anschluss wurde die DNA des PCR-Produktes mit Hilfe des Gelextraktionskits von Qiagen gereinigt.

### 3.4 Reinigung des PCR-Produktes

Die Reinigung des PCR-Produktes erfolgte zunächst durch den QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen. Den unter 3.2 beschriebenen ausgeschnittenen Banden wurde das 3-fache an Volumen des QX 1-Puffers von Qiagen hinzugegeben und für 10 Minuten in den Thermoblock bei 50 °C unter leichtem Schütteln gestellt. Das Produkt wurde dann über einen Filter zentrifugiert. Nach einmaligem Spülen des Filters mit dem QX 1-Puffer wurde die Säule zweimal mit je 350 µl PE Puffer gewaschen und zum Ende das PCR-Produkt aus dem Filter mit 50 µl Aqua bidest. gelöst.

Um den Arbeitsablauf zu optimieren, wurden weitere Möglichkeiten zum Reinigen des PCR-Produktes getestet. So wurde zusätzlich der QIAquick PCR Purification Kit verwendet. Hierbei wurde dem PCR-Produkt direkt, ohne vorheriges Ausschneiden des PCR-Produktes aus dem Gel, das 5-fache Volumen des PBI Puffers der Firma Qiagen zugeführt und nach kurzem Vortexen auf eine Filtersäule gegeben. Nach dem Zentrifugieren von 60 s bei 10.000 U/min und Raumtemperatur wurde das Produkt in der Säule zweimalig mit je 350 µl des PE Puffers gewaschen. Zum Abschluss wurde das Produkt nach dem Trocken zentrifugieren mit 50 µl Aqua bidest. aus der Säule gelöst.

Weiterhin wurde für die Reinigung des PCR-Produktes der PCR-Kombi-Kit der Firma Seq lab verwendet. Bei dieser Variante der Reinigung wurde dem gesamten PCR-Produkt 500 µl des Bindepuffers der Firma Sequece Laboratories hinzugegeben und der Mix auf eine Filtersäule aufgetragen. Nach der Zentrifugation für 2 Minuten bei 11.000 U/min und Raumtemperatur wurde das Produkt mit 50 µl Elutionspuffer aus der Säule gelöst. Da dies die schnellste und effektivste Methode zur Reinigung des PCR-Produktes war, wurde überwiegend mit dieser Methode gearbeitet.

Der QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen wurde für die PCR-Produkte bis Exon 3 verwendet. Danach wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen weitergearbeitet. Ab den PCR-Produkten von Exon 5 kam der PCR-Kombi Kit von Seq lab zum Einsatz.

Bei der Reinigung des PCR-Produktes mit dem QIAquick PCR Purification Kit und dem Seq lab PCR-Kombi-Kit konnte nach dem Reinigen im Gegensatz zum vorherigen Verfahren insgesamt mehr vom PCR-Produkt pro µl Ansatz gewonnen werden. Dies führte bei der anschließenden Sequenzierreaktion zu verstärkten Signalen bei der Sequenzanalyse, weshalb individuell, je nach Signalstärke der Bande bei der zuvor durchgeführten Gelelektrophorese, weniger des PCR-Produktes hinzugegeben wurde.

### 3.5 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierreaktion wurde unter Verwendung des BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Die Komponenten für einen Ansatz von 20 µl sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6: Sequenzieransatz für den BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit**

<b>1 x Reaktionsansatz</b>	
Sequenzierpuffer (5x)	11 µl
Terminator-Mix	2 µl
0,8 pmol Primer (fwd oder rev)	4 µl

Zu 17 µl des Sequenziermixes wurden 3 µl des gereinigten PCR-Produktes gegeben. Die Sequenzierreaktion fand anschließend in einem der unter 2.7 aufgeführten Thermocycler mit folgendem Programm statt:

Schritt 1:	96 °C	1 min	}	25 Zyklen
Schritt 2:	96 °C	10 s		
Schritt 3:	50 °C	5 s		
Schritt 4:	60 °C	4 min		
Schritt 5:	4 °C	∞		

Im Anschluss erfolgte die Fällung des Sequenzierproduktes. Hierfür wurden dem Sequenzieransatz je 2 µl EDTA (125 mM), 2 µl Natriumazetat (3 M) und 50 µl Ethanol (96 %) hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die gefällte DNA bei 4 °C und 6000 U/min für 20 min zentrifugiert. Nach dem Abpipettieren des Überstandes und dem Waschen des Pellets mit 70 %igem Ethanol wurde erneut mit 6000 rpm bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Ethanol abpipettiert und das Pellet für 10 min bei 80 °C im Thermocycler getrocknet.

Die Analyse der Proben erfolgte am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durch Frau Dr. Darmer und Herrn Dr. Christov.

### 3.6 Statistische Auswertung

Für die statistischen Datenanalysen wurde die Software der Statistical Package for the Social Science (SPSS 17.0 von IBM) verwendet.

Das Gesamtüberleben ist mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven erfasst (Abb. 23 und Abb. 25). Die verschiedenen Überlebenszeitkurven konnten durch den Log-Rank-Test miteinander verglichen werden.

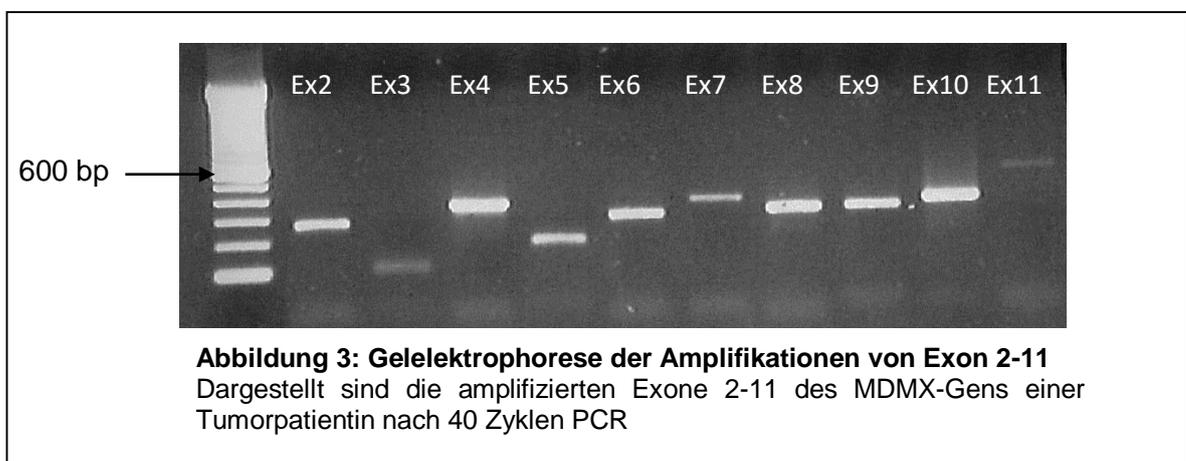
Bei dem relativen Risiko handelt es sich aufgrund der verschiedenen Prognosefaktoren (Alter, Allgemeinzustand, Resttumor, Tumorstadium) um ein multivariates Ereignis. Jedoch spielt für das Überleben des Ovarialkarzinoms der postoperative Resttumor im Gegensatz zu den anderen Faktoren die wichtigste prognostische Rolle. Da es sich hierbei um keinen unabhängigen Parameter handelt, wurde nach dem Resttumor adjustiert und das relative Risiko anschließend mittels der Cox-Regression bestimmt. Ab einem p-Wert von  $< 0,05$  gilt das Ergebnis als signifikant. Bei einem Signifikanzniveau zwischen 5 bis 10 % ( $p > 0,05$  bis  $p = 0,10$ ) wurde der gefundene Zusammenhang als Trend gewertet. Zur besseren Kennzeichnung wurden in dieser Arbeit die signifikanten p-Werte „**fett**“ hervorgehoben.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Sequenzierung des MDMX-Gens

Ziel dieser Arbeit war es, den Mutationsstatus des MDMX-Gens zu untersuchen. Aufgrund seiner negativ regulierenden Funktion in der p53-Kaskade ist anzunehmen, dass Veränderungen von MDMX auch eine Rolle in der Tumorentstehung spielen. Besonders die Überexpression von MDMX in vielen somatischen Tumoren lässt diesen Zusammenhang vermuten (Danovi *et al.*, 2004; Bartel *et al.*, 2005; Laurie *et al.*, 2006; Toledo und Wahl, 2006; Han *et al.*, 2007). Daher wurde sich in dieser Arbeit mit der Sequenzierung aller kodierenden Abschnitte des MDMX-Gens und deren flankierenden Intron-Regionen beschäftigt. Aufgrund seiner Länge wurde Exon 11 in drei sich überlappende Abschnitte sequenziert.

Das MDMX-Gen weist genau wie das MDM2-Gen einen p53-sensitiven P2-Promotor im ersten Intron auf, welcher eine wichtige Rolle in einem autoregulatorischen "Feedback-Loop" mit p53 spielt (Phillips *et al.*, 2010). Dieser Promotor wurde zusätzlich in die Untersuchungen mit eingeschlossen, da Bond *et al.* 2004 im P2-Promotor des MDM2-Gens den Einzelnukleotid-Polymorphismus SNP309 entdeckten, welcher mit einer gesteigerten Expression von MDM2 und einer daraus folgenden abgeschwächten Effektivität des p53-Pathway einhergeht (Bond *et al.*, 2004). Somit lag die Vermutung nahe, dass im P2-Promotor des MDMX-Gens ebenfalls eine Veränderung vorliegen könnte.



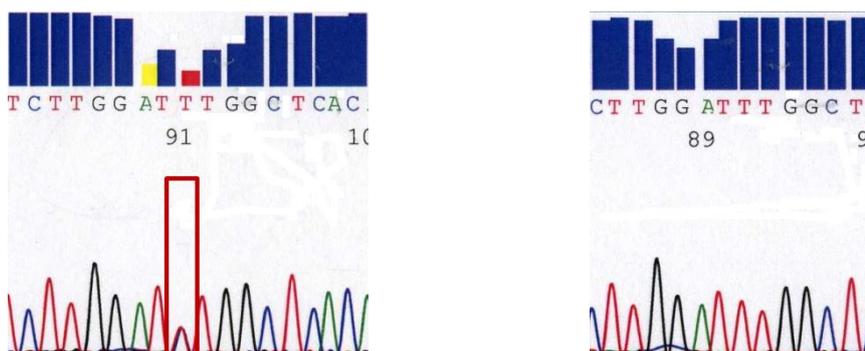
Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 17 Mutationen im MDMX-Gen erfasst, welche sich alle im Exon 11 befanden. Zusätzlich konnten die bereits bekannten Einzelnukleotid-Polymorphismen SNP 311112 im Intron 9 und SNP 31274 im Intron 10 detektiert werden.

Eine Mutation in der p53-sensitiven P2-Promotor-Region des MDMX-Gens im untersuchten Patientenkollektiv war nicht nachweisbar. Die oben genannte Vermutung bestätigte sich somit nicht. Auch in den Exonen 2-10 zeigten sich keine Veränderungen. Ausschließlich in Exon 11 waren Mutationen nachweisbar.

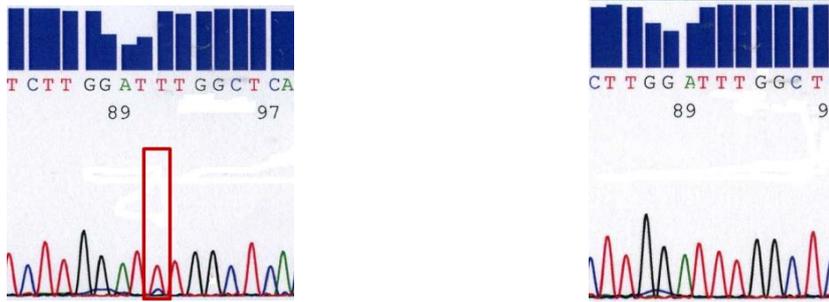
Alle Mutationen in Exon 11 sind in Tabelle 7 zusammengefasst sowie in Abbildung 4 bis 20 dargestellt.



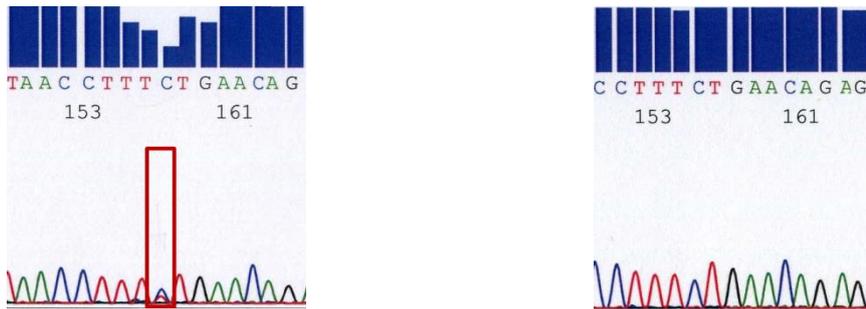
**Abbildung 4:** Exon 11 OVCA 13, links Mutation in Codon 304 (CAG>CAA; Gln>Gln), rechts Wildtyp Codon 304



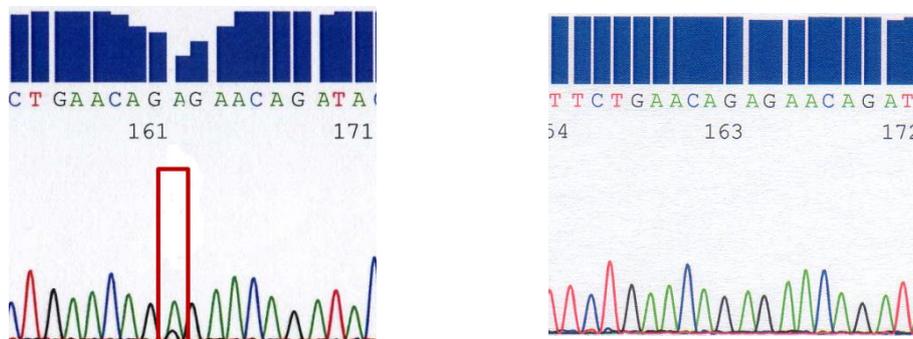
**Abbildung 5:** Exon 11 OVCA 5, links Mutation in Codon 396 (TTG>GTG; Leu>Val), rechts Wildtyp Codon 396



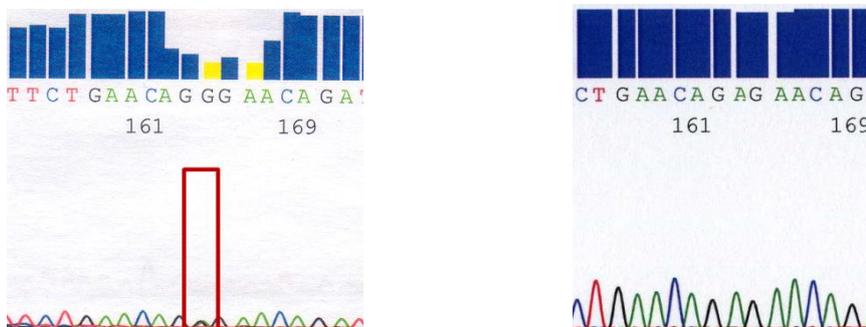
**Abbildung 6:** Exon 11 OVCA 52, links Mutation in Codon 397 (TTG>GTG; Leu>Val), rechts Wildtyp Codon 397



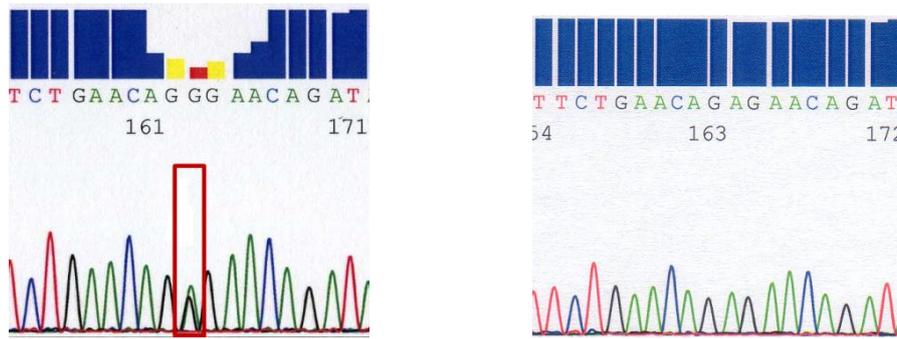
**Abbildung 7:** Exon 11 OVCA 38, links Mutation in Codon 417 (TCT>TTT; Ser>Phe), rechts Wildtyp Codon 417



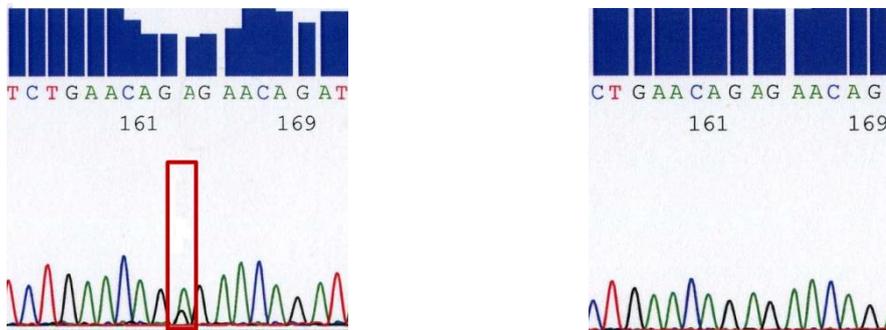
**Abbildung 8:** Exon 11 OVCA 7, links Mutation in Codon 421 (AGA>GGA; Arg>Gly), rechts Wildtyp Codon 421



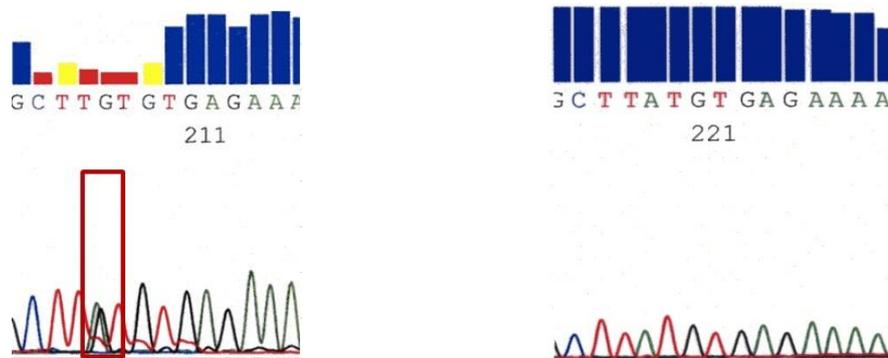
**Abbildung 9:** Exon 11 OVCA 13, links Mutation in Codon 421 (AGA>GGA; Arg>Gly), rechts Wildtyp Codon 421



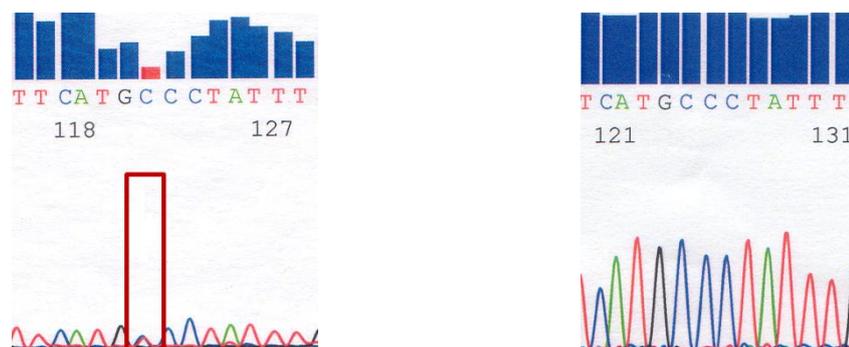
**Abbildung 10:** Exon 11 OVCA 15, links Mutation in Codon 421 (AGA>GGA; Arg>Gly), rechts Wildtyp Codon 421



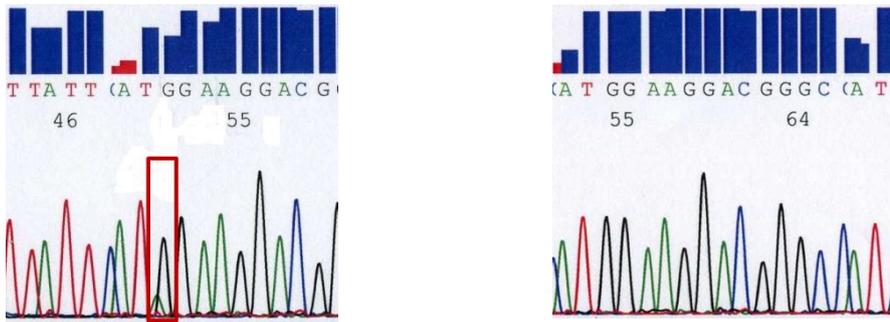
**Abbildung 11:** Exon 11 OVCA 32, links Mutation in Codon 421 (AGA>GGA; Arg>Gly), rechts Wildtyp Codon 421



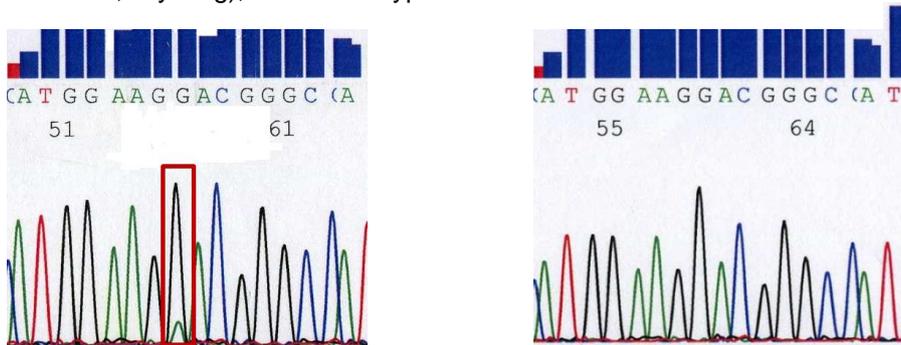
**Abbildung 12:** Exon 11 OVCA 2, links Mutation in Codon 439 (GTC>ATC; Val>Ile), rechts Wildtyp Codon 439



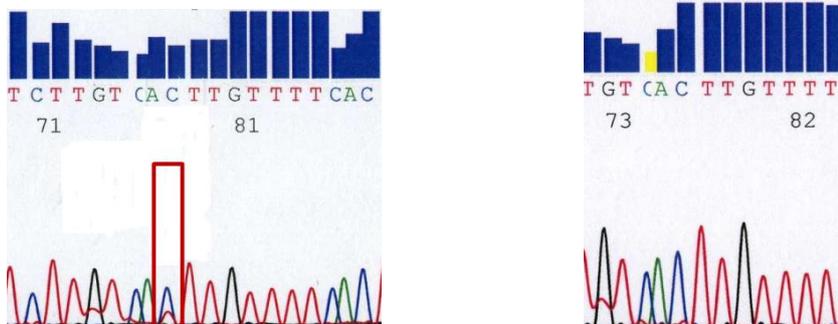
**Abbildung 13:** Exon 11 OVCA 14, links Mutation in Codon 441 (TGC>TGT; Cys>Cys), rechts Wildtyp Codon 441



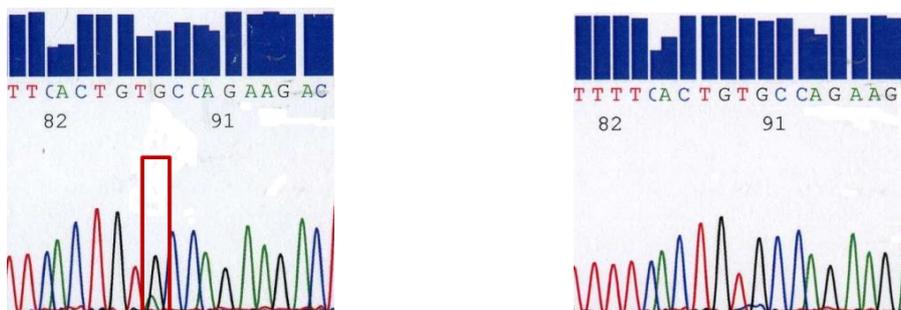
**Abbildung 14:** Exon 11 OVCA 32, links Mutation in Codon 451 (GGA>AGA; Gly>Arg), rechts Wildtyp Codon 451



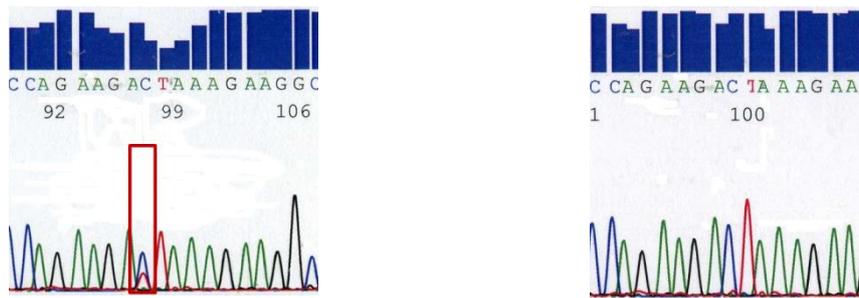
**Abbildung 15:** Exon 11 OVCA 1, links Mutation in Codon 452 (AGG>AGA; Arg>Arg), rechts Wildtyp Codon 452



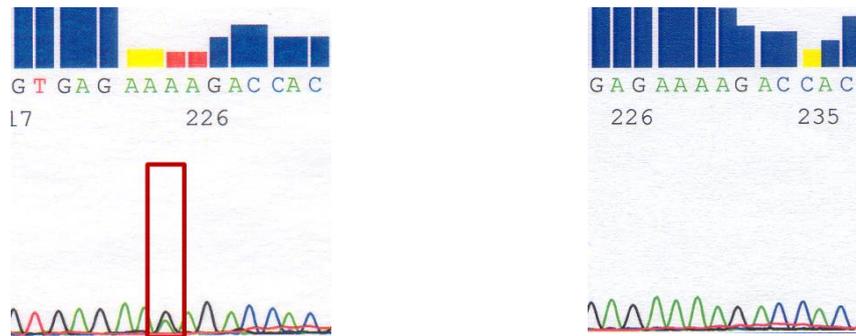
**Abbildung 16** Exon 11 OVCA 7, links Mutation in Codon 458 (ACT>ATT; Thr>Ile), rechts Wildtyp Codon 458



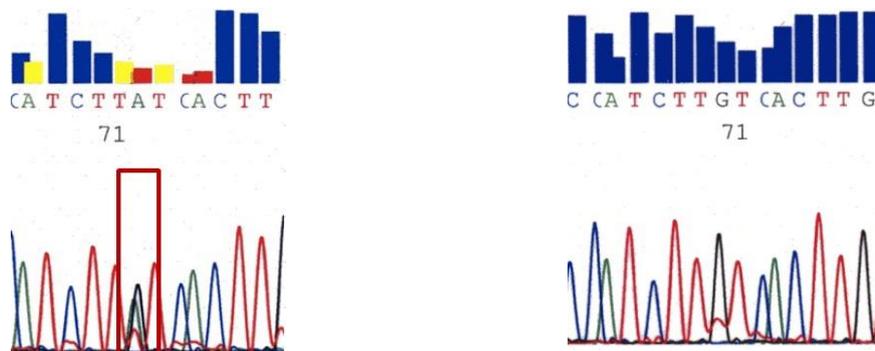
**Abbildung 17:** Exon 11 OVCA 32, links Mutation in Codon 463 (GCC>ACC; Ala>Thr), rechts Wildtyp Codon 463



**Abbildung 18:** Exon 11 OVCA 61, links Mutation in Codon 466 (CTA>TTA; Leu>Leu), rechts Wildtyp Codon 466



**Abbildung 19:** Exon 11 OVCA 14, links Mutation in Codon 473 (AAA>AAG; Lys>Lys), rechts Wildtyp Codon 473



**Abbildung 20:** Exon 11 OVCA 2, links Mutation in Codon 477 (TTA>TTG; Leu>Leu), rechts Wildtyp Codon 477

Tabelle 7: Erfasste Mutationen in Exon 11

Codon	Fall	Exon	nt	wt- Codon	mt- Codon	wt-AS	mt-AS
304	OVCA13	11	1031	CAG	CAA	Gln	Gln
396	OVCA5*	11	1305	TTG	GTG	Leu	Val
397	OVCA52*	11	1307	TTG	GTG	Leu	Val
417	OVCA38*	11	1369	TCT	TTT	Ser	Phe
421	OVCA7	11	1377	AGA	GGA	Arg	Gly
421	OVCA13	11	1377	AGA	GGA	Arg	Gly
421	OVCA15	11	1377	AGA	GGA	Arg	Gly
421	OVCA32	11	1377	AGA	GGA	Arg	Gly
439	OVCA2	11	1488	GTC	ATC	Val	Ile
441	OVCA14*	11	1488	TGC	TGT	Cys	Cys
451	OVCA32*	11	1470	GGA	AGA	Gly	Arg
452	OVCA1*	11	1358	AGG	AGA	Arg	Arg
458	OVCA7*	11	1491	ACT	ATT	Thr	Ile
463	OVCA32*	11	1506	GCC	ACC	Ala	Thr
466	OVCA61*	11	1515	CTA	TTA	Leu	Leu
473	OVCA14*	11	1584	AAA	AAG	Lys	Lys
477	OVCA2	11	1433	TTA	TTG	Leu	Leu

\* neu beschriebene Mutationen

Die Missense-Mutationen im Codon 421 (A>G; Arg>Gly) und 439 (G>A; Val>Ile) sowie die stillen Mutationen in Codon 304 (G>A; Gln>Gln) und 477 (A>G; Leu>Leu) in Exon 11 sind bereits veröffentlicht worden (Wynendaele et al., 2010). In dieser Arbeit konnten 10 weitere Punktmutationen, 6 missense und 4 stille Mutationen, in Exon 11 beschrieben werden, welche bisher noch nicht in der NCBI SNP Datenbank gelistet sind (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>).

Die bereits bekannte Missense-Mutationen im Codon 421 konnte bei insgesamt 4 Patientinnen gefunden werden. Alle weiteren Mutationen wurden jeweils immer nur bei einer Patientin detektiert.

Exon 11 des MDMX-Gens enthält die für das Protein wichtige RING-Finger Domäne, Codon 437 bis Codon 483 (Marine et al., 2004). Insgesamt 9 der beschriebenen

Mutationen liegen in dieser RING-Finger Domäne. Vier davon stellen eine Missense-Mutation dar (Codon: 439, 458, 451, 463). Der Austausch von Aminosäuren bei diesen Missense-Mutationen, z.B. der Austausch von Glycin und Arginin bei der Missense-Mutation im Codon 451, könnte möglicherweise einen Einfluss auf die Struktur und Stabilität des MDMX-Proteins haben und somit dessen Funktion beeinträchtigen.

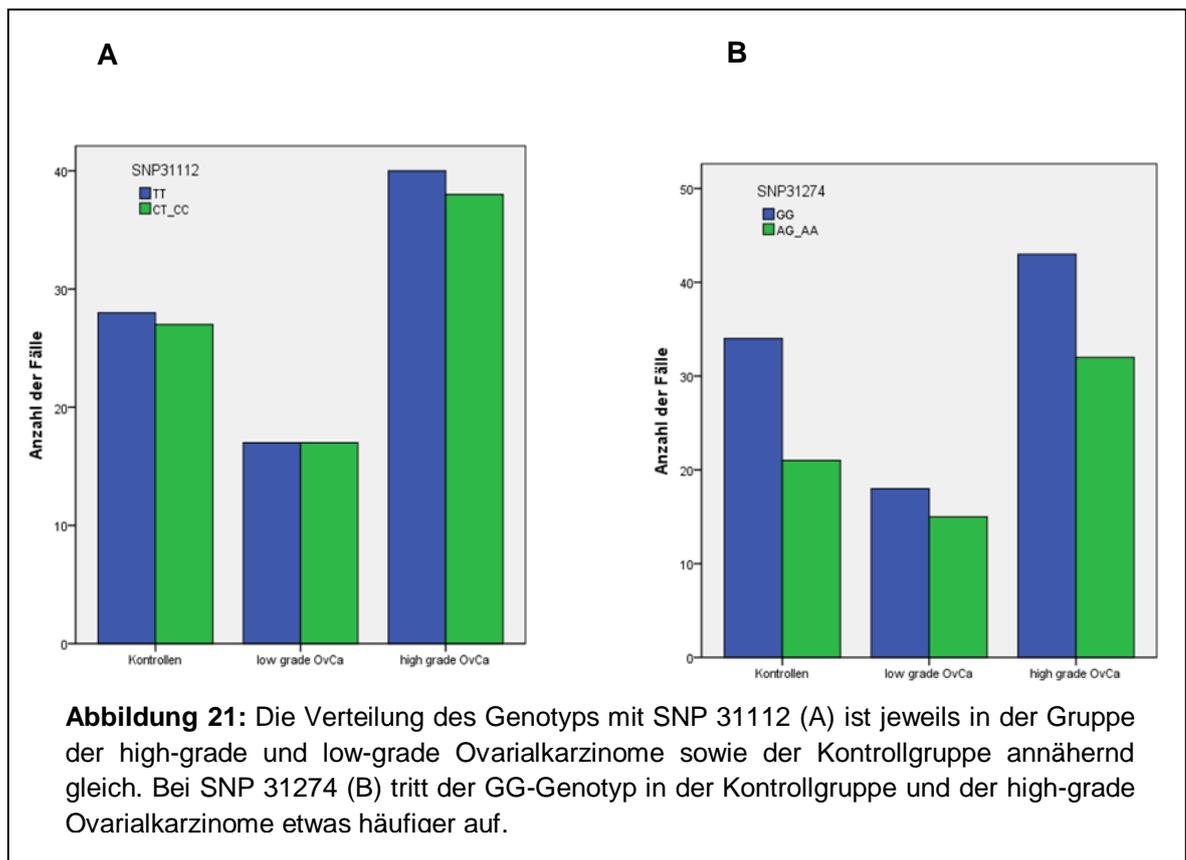
Zwei der weiteren Mutationen (Codon 396 und Codon 397) befinden sich in der Zinkfingerregion. Hier kommt es, aufgrund einer Missense-Mutation, jeweils zu einem Austausch von Leucin zu Valin. Die Funktion dieser Region ist bisher jedoch weitgehend unbekannt, was eine Deutung dieser Mutationen erschwert.

Codon 304, Codon 417 und Codon 421 liegen in der C-terminalen Region, jedoch außerhalb bekannter funktioneller Domänen.

## 4.2 SNP 31112 und SNP 31274

Neben den bereits beschriebenen Veränderungen in Exon 11 konnten weiterhin die bereits bekannten Einzelnukleotid-Polymorphismen SNP 31112 (T>C, rs2290855) im Intron 9 und SNP 31274 (G>A, rs2290854) im Intron 10 nachgewiesen werden. Daraufhin wurden zusätzlich in dieser Arbeit die klinischen Daten der Ovarialkarzinompatientinnen in Bezug auf die SNPs ausgewertet.

Hierfür verglich man zum einen das Alter bei Auftreten der Erkrankung und die mittlere Überlebenszeit der Patientinnen und berechnete jeweils das relative Risiko. Die Daten wurden zunächst für alle Patientinnen mit den verschiedenen Genotypen und anschließend zusätzlich getrennt nach ihrem Östrogenrezeptorstatus erfasst (Tab. 8).



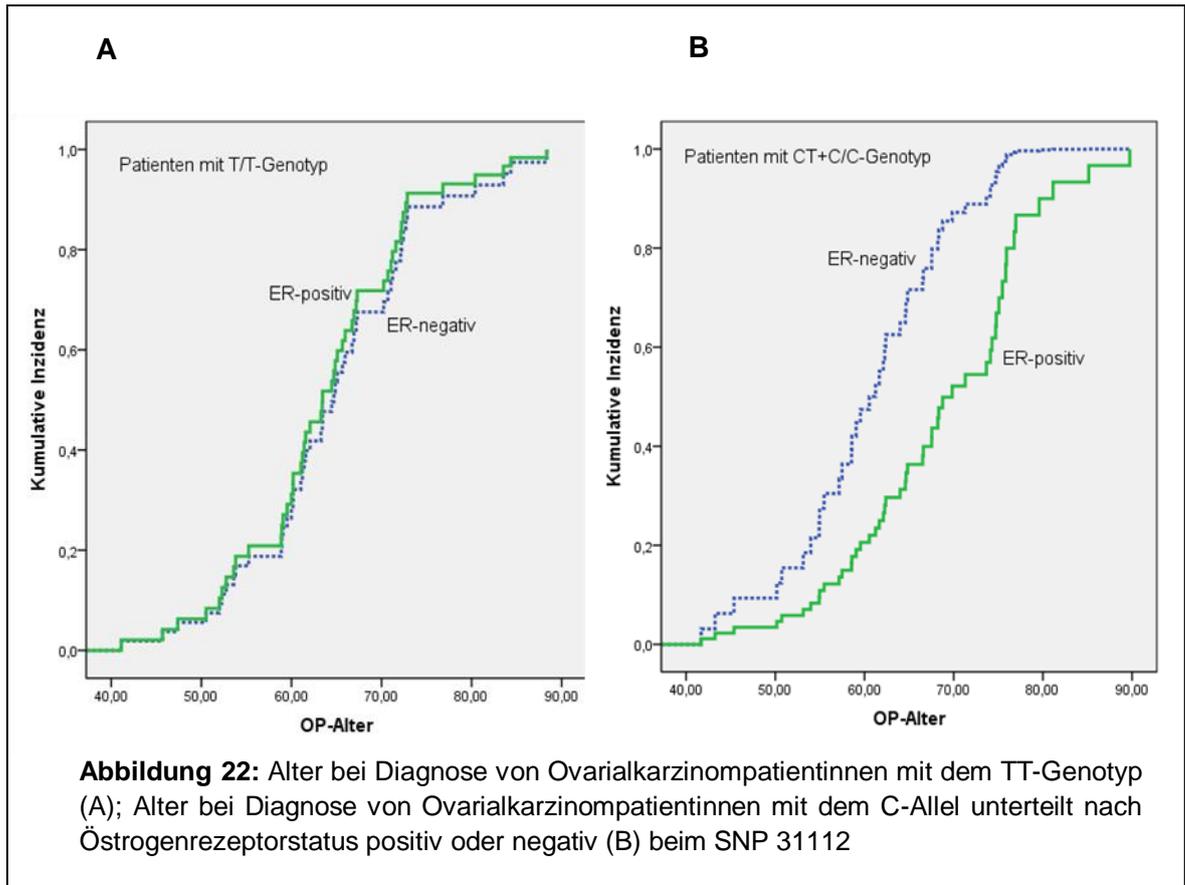
#### 4.2.1 SNP 31112 im Intron 9

Im Rahmen der Analyse konnte der Polymorphismus re2290855 im Intron 9 an Position 31112 detektiert werden. Die Verteilung der verschiedenen Genotypen stellte sich bei den Ovarialkarzinompatientinnen wie folgt dar: TT 50,5 %; TC/CC 49,5 %. Diese war vergleichbar mit der Verteilung in der Kontrollgruppe (TT 50,9 %; TC/CC 49,1 %). In Bezug auf das Alter der Patientinnen bei Diagnose des Ovarialkarzinoms zeigte sich, dass zunächst kein Unterschied zwischen den Patientinnen mit dem veränderten Allel CT/CC und dem Wildtyp TT bestand. Beim SNP 31112 liegt das mittlere Erkrankungsalter der Patientinnen mit dem TT-Genotyp bei 64,2 Jahren und bei denen mit dem CT/CC-Genotyp bei 65,2 Jahren ( $p=0.801$ ).

Betrachtet man nun die Patientinnen getrennt nach dem Östrogenrezeptorstatus, so wird deutlich, dass die Patientinnen mit einem Östrogenrezeptor-negativen Ovarialkarzinom (ER-negativ) und mindestens einem C-Allel im Durchschnitt 9 Jahre früher erkrankten im Vergleich zu den Östrogenrezeptor-positiven (ER-positiv) Patientinnen (**p 0.003**). Bei den Patientinnen mit dem TT-Genotyp konnte dieser Unterschied nicht nachgewiesen werden (s. Tab. 8, Abb. 21).

**Tabelle 8: Alter bei Diagnose mit verschiedenen Genotypen des SNP 31112 und SNP 31274**

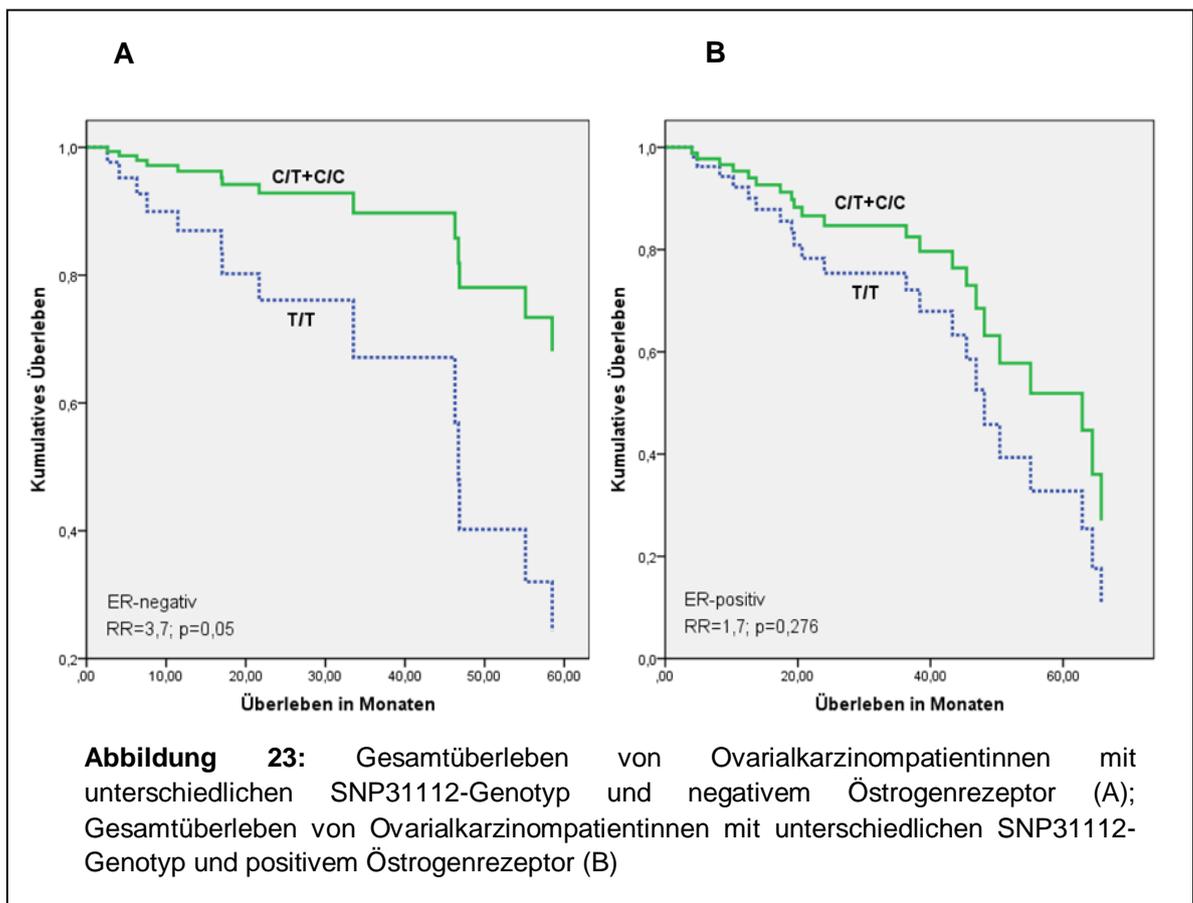
SNP	Alter bei Diagnose in Jahren	P (t-Test)	SNP	Alter bei Diagnose in Jahren	P (t-Test)
<b>SNP 31112</b>			<b>SNP 31274</b>		
alle TT	64,2	0.801	alle GG	64,2	0.871
CT+CC	65,2		AG+AA	64,4	
TT ER+	63,7	0.715	GG ER+	63,4	0.5
ER-	64,8		ER-	65,2	
CT+CC ER+	69,1	<b>0.003</b>	AG+AA ER+	68,7	<b>0.003</b>
ER-	60,3		ER-	59,2	



Bei Betrachtung des Gesamtüberlebens der Ovarialkarzinompatientinnen zeigte sich zunächst kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit zwischen den Patientinnen mit TT-Status (58,9 Monate) gegenüber denen mit dem C-Allel (64,7 Monate) ( $p=0.31$ ). Separiert man jedoch erneut nach dem ER-Status, so wird deutlich, dass die Patientinnen mit ER-negativem Ovarialkarzinom und dem C-Allel insgesamt ein längeres Überleben von ca. 23 Monaten ( $p=0.117$ ) im Gegensatz zu den Patientinnen mit TT-Status aufweisen (s. Tab. 9 und Abb. 22 A). Das Ergebnis ist mit  $p=0.117$  nicht signifikant, zeigt jedoch eine Tendenz in Bezug auf das Überleben an. Zusätzlich wurde das relative Risiko für die Patientinnen, an dem Ovarialkarzinom zu versterben, bestimmt. Es zeigte sich, dass in der Gruppe der ER-negativen Tumoren die Patientinnen mit dem homozygotem T-Allel insgesamt ein 3.7-fach erhöhtes Risiko haben, an dem Tumor zu versterben, als die Patientinnen mit dem C-Allel ( $p=0.049$ ). Weiterhin fällt in der Gruppe der Ovarialkarzinompatientinnen mit einem C-Allel auf, dass die Patientinnen mit einem ER-negativen Tumor zwar früher erkranken, jedoch insgesamt eine längere mittlere Überlebenszeit von 23,6 Monaten gegenüber den Patientinnen mit einem ER-positiven Tumor aufweisen (s. Tab. 9). Daraus ergibt sich

ein geringeres Sterberisiko für die Patientinnen mit einem C-Allel und einem ER-negativen Tumor.

Bei den Patientinnen mit einem ER-positiven Tumor konnte kein Unterschied in der mittleren Überlebenszeit zwischen denen mit dem C-Allel und denen ohne C-Allel festgestellt werden.



**Tabelle 9: Mittlere Überlebenszeit und relatives Risiko der Ovarialkarzinompatientinnen mit verschiedenen Genotypen des SNP 31112 und SNP 31274**

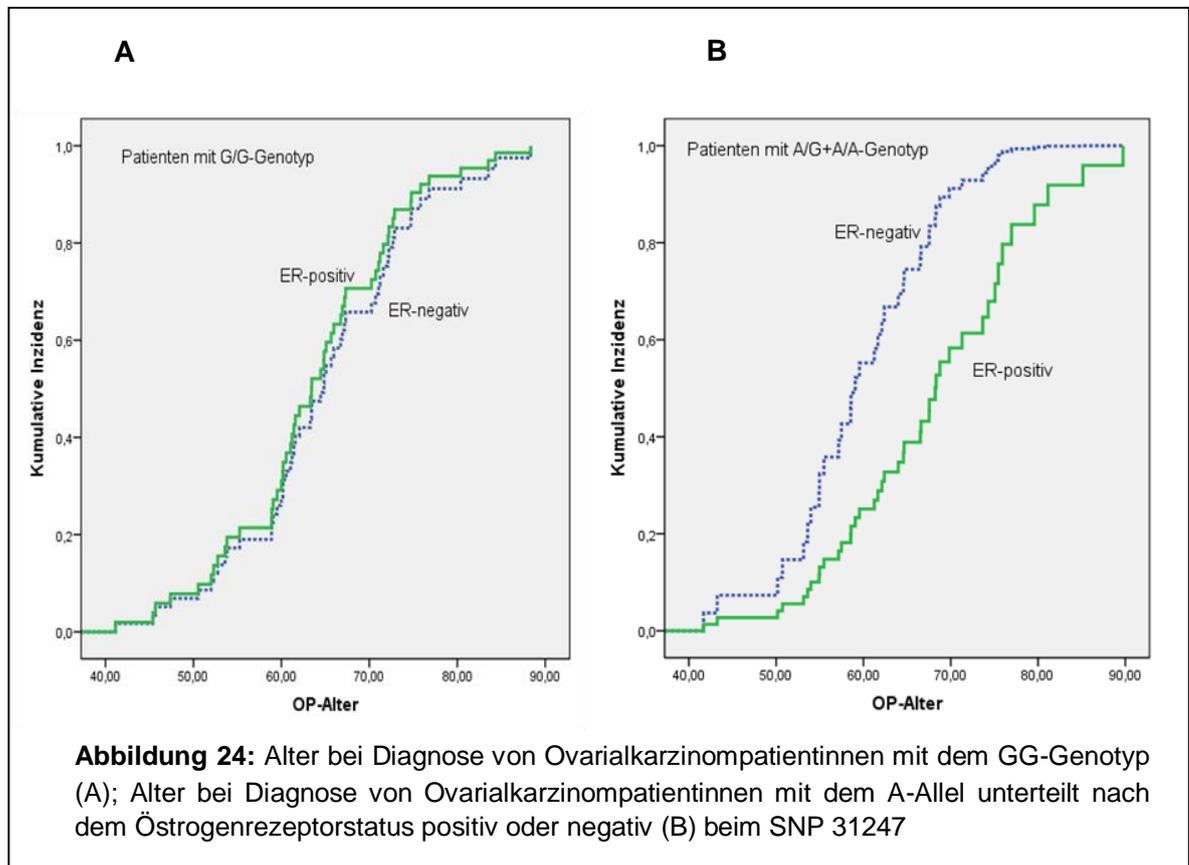
SNP		Mittlere Überlebenszeit in Monaten	p	Relatives Risiko	p
<b>SNP 31112</b>					
Alle	TT	58,9	0.31	2.3	0.027
	CT+CC	64,7		1	
ER+	TT	61	0.83	1.7	0.28
	CT+CC	49,4		1	
ER-	TT	53,4	0.117	3.7	<b>0.049</b>
	CT+CC	73		1	
<b>SNP 31274</b>					
Alle	GG	56,4	0.11	2.1	0.038
	AG+AA	66,7		1	
ER+	GG	58,2	0.885	1.3	0.53
	AG+AA	47,4		1	
ER-	GG	51,7	<b>0.048</b>	4.5	<b>0.038</b>
	AG+AA	76,8		1	

#### **4.2.2 SNP 31247 im Intron 10**

Neben dem bereits beschriebenen Polymorphismus im Intron 9 wurde der Polymorphismus an Position 31274 im Intron 10 des MDMX-Gens untersucht (G>A; rs 2290854). Die Verteilung der verschiedenen Genotypen stellte sich unter den Ovarialkarzinompatientinnen wie folgt dar: GG 56,5 %; GA und AA 43,5 %. Auch bei diesem SNP war die Verteilung der Genotypen bei den Ovarialkarzinompatientinnen und der Kontrollgruppe (GG 61,8 %; GA/ AA 38,2 %) vergleichbar.

Weiterhin zeigte sich auch hier in der Gruppe der ER-negativen Tumoren ein früheres Auftreten der Erkrankung bei den Trägerinnen des A-Allels. Insgesamt erkrankten die Patientinnen mit einem ER-negativen Tumor hier um ca. 9 Jahre früher als jene

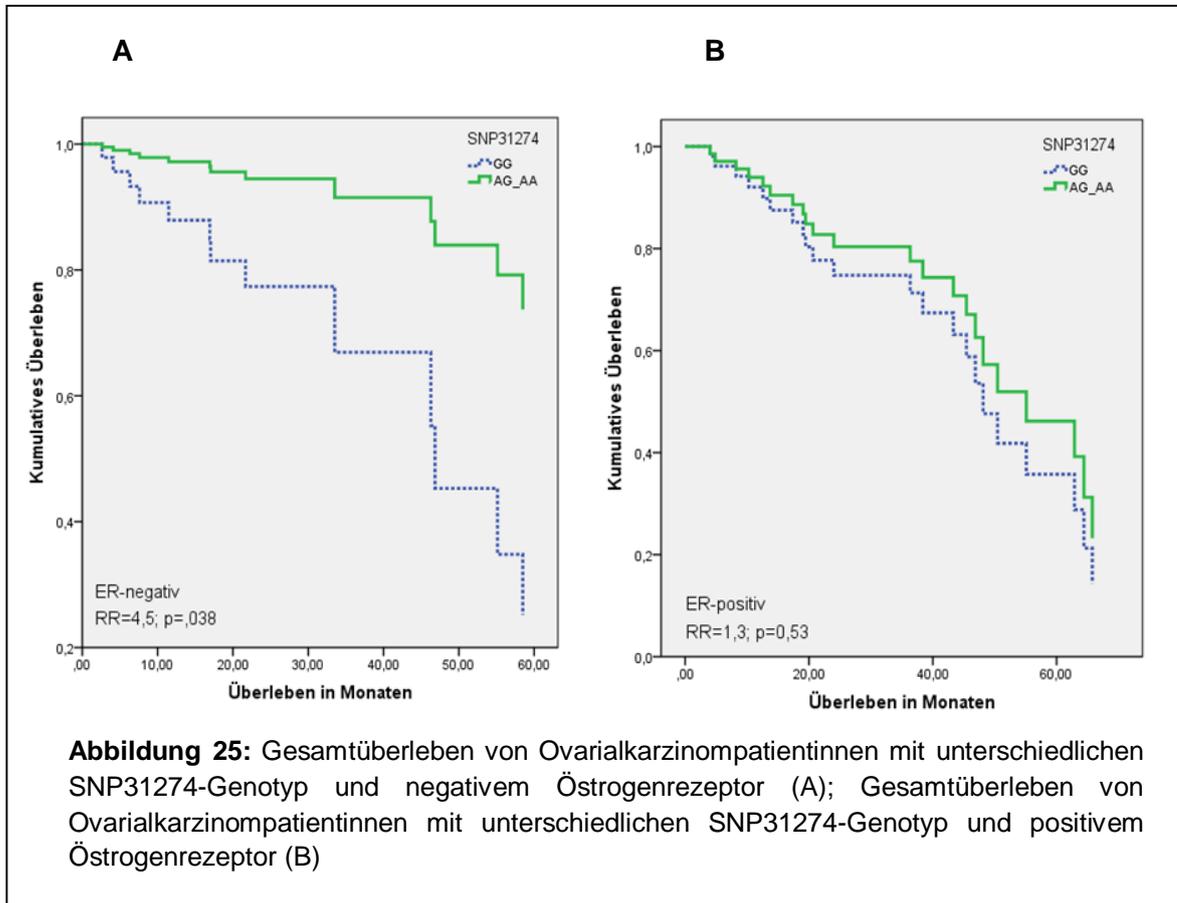
Patientinnen mit ER-positiven Tumor und dem A-Allel (**p 0.003**). Dieser Unterschied war beim homozygotem G-Allel und dem jeweiligen Rezeptorstatus nicht nachweisbar (s. Tab. 8; Abb. 24).



In Bezug auf die mittleren Überlebenszeiten konnte bei diesem Polymorphismus festgestellt werden, dass sich auch hier in der Gruppe der ER-negativen Tumoren ein signifikanter Unterschied zeigte. So wiesen in dieser Gruppe die Patientinnen mit dem A-Allel eine Überlebenszeit von 76,8 Monaten auf, während bei den Patientinnen mit dem GG-Status lediglich eine Überlebenszeit von 51,7 Monaten festgestellt werden konnte (**p 0.048**). Beim Vorliegen eines homozygoten G-Allels haben die Patientinnen mit einem ER-negativem Tumor ein 4,5-fach höheres Risiko, an diesem zu versterben gegenüber den Patientinnen mit einem A-Allel und ER-negativem Tumor (**p 0.038**) (s. Tab. 9; Abb. 25 A).

Beim SNP 31274 fällt ebenfalls in der Gruppe der A-Allel-Trägerinnen auf, dass jene mit einem ER-negativen Tumor im Vergleich zu den ER-positiven Tumoren zwar früher erkranken, jedoch die Überlebenszeit eine längere ist. Im Durchschnitt weisen diese Patientinnen eine längere mittlere Überlebenszeit von 29,4 Monaten auf (Tab. 9).

Bei den Patientinnen mit einem ER-positiven Tumor konnte kein Unterschied bei den mittleren Überlebenszeiten zwischen den Patientinnen mit dem A-Allel und denen ohne A-Allel festgestellt werden.



## 5. Diskussion

Weltweit zählen Tumoren des Urogenitalsystems zu den häufigsten Tumorerkrankungen der Frau. Das Ovarialkarzinom stand mit 225.500 Neuerkrankungen 2008 an 3. Stelle der weiblichen Genitaltumore (ACS Global Cancer Facts and Figures 2013). Die Diagnose des Ovarialkarzinoms erfolgt aufgrund fehlender signifikanter Screeningmarker meist in einem späten FIGO-Stadium, woraus sich insgesamt eine schlechte Prognose für die Patientinnen ergibt. Oft führen erst die klinischen Symptome die Patientin zum Arzt. So wird das Ovarialkarzinom bei 75-80 % der Patientinnen in den fortgeschrittenen Tumorstadien FIGO III und IV diagnostiziert (Meden *et al.*, 1996). Nach den heutigen Erkenntnissen ist der Tumorstadium nach der operativen Primärtherapie der wichtigste Prognosefaktor für die Patientinnen (AGO-Leitlinie, 2013). Neben den klinisch-pathologischen Prognosefaktoren treten in der heutigen Zeit zunehmend jedoch auch molekularbiologische Faktoren in den Fokus der Untersuchungen. Die Forschung konzentriert sich daher neben der Optimierung der operativen Therapie zur Erlangung einer postoperativen Tumorfreiheit auch immer mehr auf die Messung und Identifizierung molekularbiologischer Faktoren. Beim Ovarialkarzinom konnten zum Beispiel Mutationen im p53-Gen eine prognostische Aussagekraft zugewiesen werden, jedoch fehlen hier noch Untersuchungen an größeren Kollektiven, um diese Ergebnisse zu bestätigen (Silvestrini *et al.*, 1998, Stone *et al.*, 2003). Durch die Untersuchung der prognostischen Aussagekraft von Biomarkern kann versucht werden, die Therapieoptionen zu optimieren und die damit verbundene Lebensqualität zu erhöhen. So wurde in einer Studie von Mancini *et al.* (2009) ein besseres Ansprechen von Ovarialkarzinomen mit einer erhöhten MDMX-mRNA Expression auf eine Cisplatin-Behandlung nachgewiesen, während Tumore mit einem geringen MDMX-Expressionsniveau besonders häufig Chemoresistenzen aufwiesen. Vermutlich ist p53 durch das erhöhte MDMX-Expressionsniveau nicht in der Lage, die durch das Platin induzierten DNA-Schäden zu reparieren, wodurch ein besseres Ansprechen des Chemotherapeutikums erreicht wird. Diese Daten sollten noch in einem größeren Patientenkollektiv bestätigt werden. Das Beispiel zeigt jedoch, dass hier Patienten mit der Auswahl der Chemotherapeutika gezielter geholfen werden kann.

Ein wichtiger molekularbiologischer Faktor in der Tumorentstehung ist das Tumorsuppressorgen p53. In 50 % aller humaner Tumore liegt dieses Gen mutiert vor (Hollstein *et al.*; 1991). MDMX ist ein Protein, welches an p53 binden kann und dessen transkriptionelle Aktivität inhibiert (Momand *et al.*; 1996). Weiterhin konnte eine

Überexpression des MDMX-Gens nachgewiesen werden (Riemenschneider *et al.*, 1999; Ramor *et al.*, 2001). In einer Studie von Ramos *et al.* (2001) wurden in 30 % der untersuchten Zelllinien mit einem p53-Wildtyp-Gen eine MDMX Überexpression oder eine Expression von alternativen Proteinen nachgewiesen. Auch eine Untersuchung an der p53-Wildtyp Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 zeigte, dass das MDMX-Protein in hohen Konzentrationen exprimiert wird (Danovi *et al.*; 2004). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine erhöhte MDMX-Protein-Konzentration zur Entstehungen von Malignomen führen kann. Daher sollte in dieser Arbeit der Mutationsstatus des MDMX-Gens beim Ovarialkarzinom untersucht werden, um die Frage nach eventuellen Veränderungen und der damit verbundenen onkogenen Aktivitäten des daraus resultierenden Proteins zu beantworten.

Es wurden alle kodierenden Abschnitte des MDMX-Gens mit den flankierenden Intron-Regionen sowie der p53-sensitive P2-Promoter des MDMX-Gens bei 118 Ovarialkarzinompatientinnen sequenziert. Hierbei konnten insgesamt 17 Mutationen erfasst werden, welche sich alle im Exon 11 befanden. Dieses Exon beinhaltet die für die Funktion des Proteins notwendige RING-Finger Domäne (Marine *et al.*, 2004). Neben den bereits bekannten Mutationen im Codon 304, 421, 439 und Codon 477 (Wynendaele *et al.*, 2010), konnten 10 weitere Punktmutationen beschrieben werden. Die Missense-Mutation in Codon 421 (A>G; Arg>Gly) konnte bei 4 Patientinnen und damit am häufigsten detektiert werden. Insgesamt wurden 9 Mutationen in der RING-Finger-Domäne des MDMX-Gens nachgewiesen. MDM2 und MDMX können über ihre RING-Finger Domänen miteinander interagieren, was zu einer Unterdrückung der Autoubiquitylierung von MDM2 und somit zu dessen Stabilisierung führt (Li *et al.*, 2003, Sharp *et al.*, 1999). Möglicherweise wird diese Interaktion durch die Veränderungen in dem MDMX-Protein gestört, was zu einer Dysregulation im p53-Pathway und somit verminderten Aktivität von p53 führen könnte.

Zwei der erfassten Mutationen (Codon 396 und Codon 397) befinden sich in der Zinkfingerregion. Es handelt sich hierbei um Missense-Mutationen, bei denen es jeweils zu einem Austausch von Leucin zu Valin kommt. Da die Funktion dieser Region jedoch bisher weitgehend unbekannt ist, lässt sich die Bedeutung dieser Mutationen nur schwer deuten. Drei Codone (Codon: 304, 401 und 421) liegen in der C-terminalen Region, jedoch außerhalb bekannter funktioneller Domänen. Eine daraus resultierende Beeinflussung der Proteinstruktur lässt sich jedoch nicht ausschließen, so dass es auch hier eventuell zu einer Veränderung der Stabilität und damit Funktion kommen kann.

In einer veröffentlichten Studie von Reinke *et al.* (2008) wurde ebenfalls eine Mutationsanalyse des MDMX-Gens, jedoch bei Brustkrebspatientinnen, durchgeführt. Hier

konnten insgesamt 4 Mutationen bei 40 untersuchten Fällen gefunden werden. In drei Fällen lag eine stille Mutation in Codon 74 (A>T; Val>Val) und in einem Fall eine Missense-Mutation in Codon 153 (A>G; Asp>Gly) vor.

Ein Vergleich der Mutationen beider Arbeiten ergab keine Übereinstimmung. Die höhere Anzahl an Veränderungen in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zur Mutationsanalyse bei Brustkrebspatientinnen ist sicherlich darauf zurückzuführen, dass die Gesamtzahl der untersuchten Proben in dieser Arbeit höher war.

Insgesamt lag die Mutationsrate in der Studie von Reincke *et al.* bei 10 % und in dieser Arbeit bei 14 %. Allerdings scheint von den gefundenen Mutationen keine erhöhte onkogene Aktivität auszugehen, da von den 17 Mutationen 13 jeweils nur einmal vorkommen, hier im Einzelfall also eine Mutationsrate von gerade einmal 0,8 % vorliegt. Die Mutation im Codon 421 konnte bei den Ovarialkarzinompatientinnen vier Mal nachgewiesen werden, woraus sich eine Mutationsrate von 3 % ergibt. Aufgrund dieser geringen Anzahl der Veränderungen wird vermutet, dass diese keinen Einfluss auf die onkogene Aktivität des MDMX-Gens haben. Jedoch kann bei der Mutationsrate von insgesamt 14 % auch nicht ausgeschlossen werden, dass in einzelnen Fällen ein Zusammenhang zwischen der MDMX-Mutation und der Entstehung bzw. des Wachstums des Tumors besteht. Diesbezüglich müssten weitere Studien durchgeführt werden, um eine genaue Aussage treffen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zusätzlich die bereits bekannten Einzelnukleotid-Polymorphismen SNP 31112 (T>C, rs2290855) im Intron 9 und SNP 31274 (G>A, rs2290854) im Intron 10 nachgewiesen werden. Bei Einzelnukleotid-Polymorphismen handelt es sich um eine Sequenzveränderungen in der DNA, bei der eine Base der DNA durch eine andere ersetzt wird. Da bis zum jetzigen Zeitpunkt keine bekannten wissenschaftlichen Daten für die klinische Relevanz der beiden genannten SNPs (SNP 31112 und SNP 31274) existieren, wurden hierzu die klinischen Daten der Ovarialkarzinompatientinnen ausgewertet.

Die Verteilung der verschiedenen Genotypen war bei den beiden SNPs mit der Verteilung in der entsprechenden Kontrollgruppe vergleichbar. In Bezug auf das Alter und die mittlere Überlebenszeit ergab sich zunächst kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientinnen mit dem verändertem Allel CT/CC und dem Wildtyp TT beim SNP 31112 oder dem verändertem Allel GA/AA und dem Wildtyp GG beim SNP 31274. Betrachtete man jedoch den Östrogenrezeptorstatus (ER) der Tumore, so wurde deutlich, dass bei den ER-negativen Tumoren die Patientinnen mit dem entsprechendem SNP-Genom signifikant früher erkrankten im Gegensatz zu den Patientinnen mit dem ER-positiven

Tumoren. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in der Arbeit von Kulkarni *et al.* aus dem Jahr 2009. Hier wurde ein SNP im Intron 10 (C>T; rs1563828) bei Mammakarzinomen untersucht und nachgewiesen, dass jene Patientinnen mit dem homozygoten T-Allel und einem ER-negativen Tumor 4-5 Jahre früher an dem Tumor erkrankten als jene Patientinnen mit dem ER-positiven Tumor (Kulkarni *et al.*, 2009).

Auch bei der mittleren Überlebenszeit ist ein Unterschied erst bei Betrachtung des ER-Status auszumachen. So war bei beiden SNPs die mittlere Überlebenszeit bei den Patientinnen mit ER-negativen Tumor höher im Gegensatz zu den Patientinnen mit dem ER-positiven-Status. Es konnte gezeigt werden, dass die Patientinnen mit dem SNP 31112 oder SNP 31274 und einem ER-negativen-Status zwar früher an den Tumor erkrankten, jedoch auch die längste mittlere Überlebenszeit aufwiesen. Somit hatten diese Patientinnen ein geringeres Sterberisiko.

Die Abhängigkeit des ER-Status in Bezug auf das Gesamtüberleben ließ sich auch in anderen Studien nachweisen. In der Arbeit von Wynendaele *et al.* (2010) wurde der SNP 34091 (A>C, rs 4245739) im 3'-UTR-Bereich des MDMX-Gens bei Ovarialkarzinomen entdeckt und untersucht. Auch hier zeigte sich, dass Patientinnen mit einem C-Allel und ER-negativen Tumor eine signifikant längere mittlere Lebenserwartung hatten. Dieser Polymorphismus korrelierte jedoch nicht mit einem früheren Tumoraufreten (Wynendaele *et al.*, 2010).

In einer ähnlichen Studie wurde der SNP309 (T>G) in der P2-Promotorregion des MDM2-Gens bei 150 Ovarialkarzinompatientinnen untersucht (Galic *et al.*; 2007). Ein Zusammenhang zwischen dem veränderten Allel und der Überlebenszeit konnte hier nicht gezeigt werden, jedoch fand die ER-Expression in den Ovarialkarzinomen keine Berücksichtigung. In der Studie von Bartel *et al.* (2008) wurde dann die ER-Expression beim SNP 309 in Ovarialkarzinomen näher untersucht. Daraufhin zeigte sich, dass Patientinnen mit einem ER-negativen Tumor und dem G-Allel eine signifikant verlängerte Überlebenszeit hatten (Bartel *et al.*, 2008).

Insgesamt ließ sich nachweisen, dass die unterschiedlichen genetischen Varianten des MDMX-Gens und auch die hormonellen Bedingungen die Tumorentstehung und die Überlebenszeit bei Ovarialkarzinompatientinnen beeinflussen und die Patientinnen mit einem ER-negativen Tumor die besseren Überlebenszeiten aufweisen. Bei den ER-positiven Tumoren spielt der Polymorphismus in Bezug auf das Überleben möglicherweise keine Rolle, da die Wirkung der Geschlechtshormone hier größer ist.

Es ist zu vermuten, dass beim MDMX-Gen keine aktivierenden Mutationen vorliegen, sondern die Veränderungen eher zu einer Genamplifikation mit einer Überexpression von

MDMX und somit zur p53-Inaktivierung führen. Wynendaele *et al.* (2010) konnte solch einen Zusammenhang zwischen SNP 34091 und dem MDMX-Expressionsniveau nachweisen.

Diaz-Padilla *et al.* haben 2011 eine zusammenfassende Arbeit aller Studien von 2006 bis April 2011, welche sich mit prognostischen Biomarkern in gynäkologischen Tumoren beschäftigten, veröffentlicht (Diaz-Padilla *et al.*, 2011). Diese Studien beinhalteten besonders die Untersuchungen von Polymorphismen in Ovarial-, Endometrium-, Zervix- und Vulvakarzinomen. Am häufigsten wurden hierbei das ERCC1-, VEGF-, ABCB1- (MDR) und GSTP1-Gen untersucht. Auch Studien zu MDM2 und MDMX gingen in diese Arbeit mit ein. In dem Review wird deutlich, dass die Verwendung von standardisierten Methoden und auch hohe Fallzahlen eine Notwendigkeit für die Gewinnung von validen Daten für den klinischen Alltag sind. Die Studiendesigns der Arbeiten sind oft sehr unterschiedlich und somit schwer vergleichbar.

In Bezug auf diese Arbeit sollte, um die Rolle der Polymorphismen als prognostischen Faktor bei Ovarialkarzinompatientinnen zu beurteilen, die durchgeführten Untersuchungen in anderen Tumoren und mit höheren Fallzahlen wiederholt werden. Besonders von Interesse wäre hierbei das Mammakarzinom, da auch hier eine Korrelation zu den Geschlechtshormonen bekannt ist. Zusammenfassend lässt sich aber sagen, dass die beschriebenen Polymorphismen des MDMX-Gens mit der Tumorentstehung und der Überlebenszeit von Ovarialkarzinompatientinnen assoziiert sind. Somit kann diesen SNPs möglicherweise eine prognostische Aussagekraft zugeschrieben werden.

## 6. Zusammenfassung

MDMX ist ein wichtiger p53 Regulator, welcher in nahezu allen Geweben exprimiert wird. Durch Bindung an den Tumorsuppressor p53 kann das MDMX-Protein dessen transkriptionelle Aktivität inhibieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein MDMX-knock-out in Mäusen embryonal letal ist. Durch einen gleichzeitigen p53-knock-out kann dieser Effekt aufgehoben werden. Dies lässt vermuten, dass Veränderungen im MDMX-Gen die Funktion von p53 beeinflussen und somit auch eine entscheidende Rolle in der Tumorentstehung spielen können.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Mutationsstatus des MDMX-Gens beim Ovarialkarzinom zu untersuchen, um einen Zusammenhang bei der Tumorentstehung zu beurteilen. Hierfür wurde von 118 Ovarialkarzinompatientinnen der codierende Bereich des MDMX-Gens aus den in Paraffin eingebetteten Gewebeproben isoliert, dann mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert.

Es konnten 17 Mutationen identifiziert werden, von denen 4 bereits beschrieben waren. Alle Mutationen fanden sich im Exon 11, welches die für die Funktion des Proteins notwendige RING-Finger Domäne enthält. Möglicherweise haben diese Mutationen einen Einfluss auf die Stabilität und Struktur und damit Funktion der RING-Finger Domäne. Hierzu fehlen jedoch weiterführende Untersuchungen. Insgesamt ist die Anzahl der Mutationen, auch in vergleichenden Studien gering, weshalb angenommen werden kann, dass von diesen Veränderungen keine onkogene Aktivität ausgeht. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass vereinzelt ein Zusammenhang zwischen der MDMX-Mutation und der Entstehung bzw. dem Wachstum des Tumors besteht.

Weiterhin konnten die bereits bekannten Einzelnukleotid-Polymorphismen SNP 31112 (T>C, rs2290855) im Intron 9 und SNP 31274 (G>A, rs2290854) im Intron 10 detektiert werden. Hierzu wurden die klinischen Daten der Ovarialkarzinompatientinnen in Bezug auf die SNPs ausgewertet. Es zeigte sich, dass die genetischen Varianten des MDMX-Gens besonders bei den hormonrezeptornegativen Tumoren einen Einfluss auf die Tumorentstehung und die Überlebenszeit bei den Ovarialkarzinompatientinnen haben. Die Patientinnen mit dem veränderten Allel und einem ER-negativen Tumor zeigten ein früheres Auftreten der Erkrankung und eine längere Überlebenszeit.

## 7. Literaturverzeichnis

American Cancer Society (2013) Global Cancer Facts & Figures 2nd Edition; Figure 1. Estimated New Cancer Cases and Deaths Worldwide for Leading Cancer Sites by Level of Economic Development, 2008

AGO-Leitlinie (2013) Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V., S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren

Bartel F, Meye A, Wurl P, Kappler M, Bache M, Lautenschlager C, Grunbaum U, Schmidt H, Taubert H (2001a) Amplification of the MDM2 gene, but not expression of splice variants of MDM2 mRNA, is associated with prognosis in soft tissue sarcoma. *Int. J. Cancer* 95: 168-175.

Bartel F, Taylor AC, Taubert H, Harris LC (2001b) Novel mdm2 splice variants identified in pediatric rhabdomyosarcoma tumors and cell lines. *Oncol. Res.* 12: 451-457.

Bartel F, Taubert H, Harris LC (2002) Alternative and aberrant splicing of MDM2 mRNA in human cancer. *Cancer Cell* 2: 9-15.

Bartel F, Schulz J, Bohnke A, Blumke K, Kappler M, Bache M, Schmidt H, Wurl P, Taubert H, Hauptmann S (2005) Significance of HDMX-S (or MDM4) mRNA splice variant overexpression and HDMX gene amplification on primary soft tissue sarcoma prognosis. *Int. J. Cancer* 117: 469-475.

Bartel F, Jung J, Böhnke A, Gradhand E, Zeng K, Thomssen C, Hauptmann S (2008) Both germ line and somatic genetics of the p53 pathway affect ovarian cancer incidence and survival. *Clin. Cancer Res.* 14: 89-96.

Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Yip L, Hwang S, Strong LC, Lozano G, Levine AJ (2004) A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 Tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell.* 119: 591-602.

Bond GL, Hu W, Levine A (2005) A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene: From a molecular and cellular explanation to clinical effect. *Cancer Res.* 65: 5481-5484.

Bond GL et al. (2006) MDM2 SNP309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner. *Cancer Res.* 66: 5104-5110.

Brown O, Palmer C (2009) The Preclinical Natural History of Serous Ovarian Cancer: Defining the Target for Early Detection. *Plos Medicine* Vol. 6 Issue 7: 1-14.

Danovi D et al. (2004) Amplification of Mdmx (or Mdm4) directly contributes to tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity. *Mol. Cell Biol.* 24: 5835-5843.

Diaz-Padilla I, Amir E, Marsh S, Liu G, Mackay H (2011) Genetic polymorphisms as predictive and prognostic biomarkers in gynecological cancers: A systematic review. *Gynecologic Oncology* 124 (2012): 354-365.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS, Bradley A (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356: 215-221.

Dogan E, Saygili U, Tuna B, Gol M, Gurel D, Acar B, Koyuncuoglu M (2005) p53 and mdm2 as prognostic indicators in patients with epithelial ovarian cancer: A multivariate analysis. *Gynecol Oncol* 97: 46-52.

Engel J, Schubert-Fritschle G (2001) Epidemiologie in Kuhn: Manual maligne Ovarialtumoren Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München: 1-9.

Enomoto T, Kuragaki C, Yamasaki M, Sugita N et al. (2003) Is Clear Cell Carcinoma and Mucinous Carcinoma of the Ovary Sensitive to Combination Chemotherapy with Paclitaxel and Carboplatin? 39th ASCO Annual Meeting Abstract: 1797.

Fakharzadeh SS, Trusko SP, George DL (1991) Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J* 10: 1565-1569.

Fathalla MF (1971) Incessant ovulation-a factor in ovarian neoplasia. *Lancet* 2: 163.

Galic V, Willner J., Wollan M, Garg R, Garcia R, Goff BA, Gray HJ, and Swisher, E.M. (2007) Common polymorphisms in TP53 and MDM2 and the relationship to TP53 mutations and clinical outcomes in women with ovarian and peritoneal carcinomas. *Genes Chromosomes. Cancer* 46: 239-247.

Haines D, Landers J, Engle L, George D (1994) Physical and functional interaction between wild-type p53 and mdm2 proteins. *Mol. Cell Biol.* 14: 1171-1178.

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387: 296-299.

Hauptmann S, Denkert C, Koch I, Petersen S, Schluns K, Reles A, Dietel M, Petersen I (2002) Genetic alterations in epithelial ovarian tumors analyzed by comparative genomic hybridization. *Hum Pathol* 33: 632-641.

Heintz APM, Odicino F, Maissoneuwe P, Beller U, Benedet JL, Creasman WT, Ngan HYS, Pecorelli S. (2003) Carcinoma of the Ovary, In 25th Annual Report on the results of treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynecol Obstet* 83 (Suppl 1):135-66.

Hess V, A'Hern RP; Gore ME (2003) Relative Platinum – Resistance of Mucinous Carcinoma of the Ovary. 39th ASCO Annual Meeting Abstract: 1796.

Honda R, Yasuda H (2000) Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene* 19: 1473-1476.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53.

Holschneider CH, Berek JS (2000) Ovarian Cancer: Epidemiology, Biology, and Prognostic Factors. *Seminars in Surgical Oncology* 19: 3-10.

Hori,M., Shimazaki,J., Inagawa,S., Itabashi,M., and Hori,M. (2000) Alternatively spliced MDM2 transcripts in human breast cancer in relation to tumor necrosis and lymph node involvement. *Pathol. Int.* 50, 786-792.

Jacobs I, Oram D, Fairbanks J, Turner J, Frost C, Grudzinskas JG. (1990) A risk of malignancy index incorporating CA 125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol* 97: 922-9.

Jackson M, Berberich S (2000) MdmX Protects p53 from Mdm2-Mediated Degradation. *Molecular and Cellular Biology* Vol. 20 No. 3: 1001-1007.

Kappes S, Milde-Langosch K, Kressin P, Passlack B, Dockhorn-Dworniczak B, Rohlke P, Loning T (1995) p53 mutations in ovarian tumors, detected by temperature-gradient gel electrophoresis, direct sequencing and immunohistochemistry. *Int J Cancer* 64: 52-59.

Kerbrat P, Lhomme C, Fervers B, Guastalla JP, Thomas L, Tournemaine N et al. (2001) Ovarian cancer. *Br.J.Cancer*; 84 (Suppl 2):18-23.

Kosary C (2007) Cancer of the ovary. National Cancer Institute, Seer survival monograph Chapter 16: 133-144.

Kraus A, Neff F, Behn M, Schuermann M, Muenkel K, Schlegel J (1999) Expression of alternatively spliced mdm2 transcripts correlates with stabilized wild-type p53 protein in human glioblastoma cells. *Int. J. Cancer* 80: 930-934.

Kress M, May E, Cassingena R, May P (1979) Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* 31: 472-483.

Kristensen GB, Trope C (1997) Epithelial ovarian carcinoma. *Lancet* 349: 113-117.

Kulkarni DA, Vazquez A, Haffty BG, Bandera EV, Hu W, Sun YY, Toppmeyer DL, Levine AJ, Hirshfield KM (2009) A polymorphic variant in human MDM4 associates with accelerated age of onset of estrogen receptor negative breast cancer. *Carcinogenesis* 30: 1910-1915.

Landen CN, Jr. Birrer MJ, Sood AK (2008) Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 26: 995-1005.

Lane DP and Crawford LV (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261-263.

Lane DP (1992) p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16.

- Laurie NA et al. (2006) Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature* 444: 61-66.
- Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, Gu W (2003) Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 302: 1972-1975.
- Linares LK, Hengstermann A, Ciechanover A, Mueller S, Scheffner M (2003) HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12009-12014.
- Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331.
- Linzer DI und Levine AJ (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52.
- Lukas J, Gao DQ, Keshmeshian M, Wen WH, Tsao-Wei D, Rosenberg S, Press MF (2001) Alternative and aberrant messenger RNA splicing of the mdm2 oncogene in invasive breast cancer. *Cancer Res.* 61: 3212-3219.
- Lutz L, Kuhn W, Späthe K (2001) Chemotherapie in Kuhn: „Manual maligne Ovarialtumoren Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München: 35-77.
- Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr., Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250: 1233-1238.
- Mancini F, Di Conza G, Moretti F (2009) MDM4 (MDMX) and its Transcript Variants. *Current Genomics* 10: 42-50.
- Mancini F *et al.* (2009) MDM4 (MDMX) localizes at the mitochondria and facilitates the p53-mediated intrinsic-apoptotic pathway. *EMBO J.* 28: 1926-1939.
- Marine JC, Jochemsen AG (2004) Mdmx and Mdm2: brothers in arms? *Cell Cycle* 3: 900-904.
- Markman M (1998) Recurrence within 6 months of platinum therapy: an adequate definition of "platinum-refractory" ovarian cancer? *Gynecol Oncol* 69: 91-92.
- Matsumoto R, Tada M, Nozaki M, Zhang CL, Sawamura Y, Abe H (1998) Short alternative splice transcripts of the mdm2 oncogene correlate to malignancy in human astrocytic neoplasms. *Cancer Res.* 58: 609-613.
- Meden H, Kuhn W (1997) Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER2/neu) in ovarian cancer: a new prognostic factor. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductiv Biology* 71:173-179.

- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69: 1237-1245.
- Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J (1998) The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res.* 26: 3453-3459.
- Morgan RJ, Copeland L, Gershenson D, Locker G, McIntosh D, Ozols, R. F. et al. (1996) NCCN Ovarian Cancer Practice Guidelines. *Oncology (Huntingt)* 10: 293-310.
- Nahas W.A. (1997) Ovarian cancer-Current outlook on this deadly disease-Postgraduate medicine. Vol 102, No 3
- Narod SA, Sun P, Ghadirian P, Lynch H, Isaacs C, Garber J, Weber B, Karlan B, Fishman D, Rosen B, Tung N, Neuhausen S (2001) Tubal ligation and risk of ovarian cancer in carriers of BRCA 1 or BRCA 2 mutations: a case-control study. *Lancet* 357: 1467-1470.
- NIH: „National Institutes of Health” Consensus Development Conference Statement. Ovarian Cancer (1994) Screening, Treatment, and Follow-up. *Gynecologic Oncology* 55: 4-12.
- Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B (1992) Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358: 80-83.
- Olson D et al. (1993) Identification and characterization of multiple mdm-2 proteins and mdm- 2-p53 protein complexe. *Oncogene* 8: 2353-2360.
- Pfisterer J, du Bois A (2002) Das Ovarialkarzinom. Therapeutische Standards – klinische Empfehlungen. Thieme Verlag Stuttgart New York
- Phillips A, Teunisse A, Lam S, Lodder K, Darley M, Emaduddin M, et al. (2010) HDMX-L is expressed from a functional p53-responsive promoter in the first intron of the HDMX gene and participates in an autoregulatory feedback loop to control p53 activity. *J Biol Chem.* 285: 29111-29127.
- Picksley S & Lane D (1993) The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? *Bioessays* 15: 689-690.
- Ramos YF, Stad R, Attema J., Peltenburg L.T.C., van der Eb AJ, Jochemsen A (2001) Aberrant expression of HDMX proteins in tumor cells correlates with wild-type p53. *Cancer Res* 61: 1839-1842.
- Rayburn E, Ruiwen Z, Jie H, Hui W (2005) MDM2 and Human Malignancies: Expression, Clinical Pathology, Prognostic Markers, and Implications for Chemotherapy. *Current Cancer Drug Target* 5: 27-41.

- Reincke S, Govbakh L, Wilhelm B, Jin H, Bogdanova N, Bremer M, Karstens JH, Dork T (2008) Mutation analysis of the MDM4 gene in German breast cancer patients. *BMC Cancer* 8: 52
- Reles A, Wein U, Lichtenegger W (1997) Transvaginal color Doppler sonography and conventional sonography in the preoperative assessment of adnexal masses. *J Clin Ultrasound* 25: 217 – 25.
- Riemenschneider MJ, Buschges R, Wolter M, Reifenberger J, Bostrom J, Kraus JA, Schlegel U, Reifenberger G (1999) Amplification and overexpression of the MDM4 (MDMX) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without TP53 mutation or MDM2 amplification. *Cancer Res.* 59: 6091-6096.
- Righetti SC, Della TG, Pilotti S, Menard S, Ottone F, Colnaghi MI, Pierotti MA, Lavarino C, Cornarotti M, Oriana S, Bohm S, Bresciani GL, Spatti G, Zunino F (1996) A comparative study of p53 gene mutations, protein accumulation, and response to cisplatin-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *Cancer Res* 56: 689-693.
- Riman T, Persson I, Nilsson S (1998) Hormonal aspects of epithelial ovarian cancer: review of epidemiological evidence. *Clin Endocrinol* 49: 695 – 707.
- Scharf A, Günter HH, S Sohn (2002) Screening auf Ovariakarzinom. *Der Gynäkologe* 35: 537- 547.
- Scully RE, Sobin LH et al .(1999) International histological classification of tumours. Histological typing of ovarian tumours. World Health Organization (WHO) Springer Heidelberg 1999.
- Sehouli J, Akdogan Z, Heinze T, Könsgen D, Stengel D, Mustea A, Lichtenegger W (2003) Preoperative Determination of CASA (Cancer Associated Serum Antigen) and CA125 for the Discrimination between Benign and Malignant Pelvic Tumor Mass: A Prospective Study. *Anticancer Res.* 23: 1115-1118.
- Sharp DA, Kratowicz SA, Sank MJ, George DL (1999) Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. *J. Biol. Chem.* 274: 38189-38196.
- Shih I, Kurman RJ (2004) Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am. J. Pathol.* 164: 1511-1518.
- Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Akiyama F, Silverberg SG (1998) Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: Testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up. *Cancer* 82: 893-901.
- Shvarts A, Bazuine M, Dekker P, Ramos YF, Steegenga WT, Merckx G, van Ham RC, van der Houven van Oordt, van der Eb AJ, Jochemsen AG (1997) Isolation and identification of the human homolog of a new p53-binding protein, Mdmx. *Genomics* 43: 34-42.

Shvarts A, Steegenga WT, Riteco N, van LT, Dekker P, Bazuine M, van Ham RC, van der Houven van Oordt, Hateboer G, van der Eb AJ, Jochemsen AG (1996) MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *EMBO J* 15: 5349-5357.

Sigalas I, Calvert A, Anderson J, Neal D, Lunec J (1996) Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences: transforming ability and frequent detection in human cancer. *Nat Med.* 2: 912-917.

Silvenberg (1989) SG-Prognostic significance of pathologic features of ovarian carcinoma (Review). *Current Topics Pathol*; 78: 85-109.

Silvestrini R, Daidone MG, Veneroni S, Benini E, Scarfone G, Zanaboni F, Villa A, Presti M, Danese S, Bolis G (1998) The clinical predictivity of biomarkers of stage III-IV epithelial ovarian cancer in a prospective randomized treatment protocol. *Cancer* 82: 159-167.

Singer G et al. (2005) Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation. *Am. J. Surg. Pathol.* 29: 218-224.

Singh Atwal G, Kirchhoff T, Bond E, Montagna M, Menin C, Bertorelle R, Scaini M, Bartel F, Böhnke A, Pempe C, Gradhand E, Hauptmann S, Offit K, Levine A, Bond G (2009) Altered tumor formation and evolutionary selection of genetic variants in the human MDM4 oncogene. *PNAS* Vol. 106, No. 25: 10236-10241.

Stone B, Schummer M, Paley P, Thompson L, Stewart J, Ford M, Crawford M, Urban N, O'Briant, Nelson B. (2002) Serologic analysis of ovarian tumor antigens reveals a bias toward antigens encoded on 17q. *Int J Cancer* 104:73-84.

Toledo F, Wahl G (2006) Regulation the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nature Reviews Cancer* Vol. 6: 909-923.

Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, Vermorken JB, Mangioni C, Madronal C, Franchi M, Tateo S, Zanetta G, Scarfone G, Giurgea L, Timmers P, Coens C, Pecorelli S (2003) Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma. European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J Natl Cancer Inst.* 95:113-25.

UICC: International Union against Cancer, Sobin LH, Wittekind C (1997) *TNM Classification of malignant tumors.* Wiley-Liss New York

Yancik R (1993) Ovarian cancer: Age contrasts in incidence, histology, disease stage at diagnosis, and mortality. Review, *Cancer* 1993; 71 (2 Suppl): 517-523.

Wenham RM, Lancaster JM, Berchuck A (2002) Molecular aspects of ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 16: 483-497.

Wynendaele J, Böhnke A, Leucci E, Nielsen S, Lambertz I, Hammer S, Sbzresny N, Kubitzka D, Wolf A, Gradhand E, Balschun K, Braicu I, Sehoul J, Darb-Esfahani S, Denkert C, Thomssen Ch, Hauptmann St, Lund A, Marine J-C, and Bartel F (2009) An illegitimate microRNA Target Site within 3'UTR of MDM4 Affects Ovarian Cancer Progression and Chemosensitivity. *Cancer Research* 70(23), Oct. 2010.

Ziółkowska-Seta I, Madry R, Kraszewska E, Szymanska T, Timorek A, Rembiszewska A, Kupryjanczyk J (2009) TP53, BCL-2 and BAX analysis in 199 ovarian cancer patients treated with taxane-platinum regimens. *Gynecol Oncol* 112:179-84.

## 8. Tabellenanhang

Tabelle 10: Stadieneinteilung nach FIGO und pTNM

<u>TNM</u>	<u>FIGO</u>	<u>Beschreibung</u>
<b>TX</b>		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
<b>T0</b>		Kein Anhalt für Primärtumor
<b>T1</b>	<b>I</b>	<b>Tumor auf Ovarien beschränkt</b>
T1a	IA	Tumor auf ein Ovar begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars
T1b	IB	Tumor auf beide Ovarien begrenzt; Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche beider Ovarien
T1c	IC	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien mit Kapselruptur, Tumor an Ovaroberfläche oder maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
<b>T2</b>	<b>II</b>	<b>Tumor eines Ovars oder beider Ovarien, Ausdehnung auf das kleine Becken beschränkt</b>
T2a	IIA	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube(n)
T2b	IIB	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
T2c	IIC	Ausbreitung im Becken (2a oder 2b) und maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
<b>T3</b>	<b>III</b>	<b>Tumor in einem Ovar oder beiden Ovarien, intraperitoneale Metastasen außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen, Befall von Omentum majus, Dünndarm oder Leberkapsel</b>
T3a	IIIA	mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
T3b	IIIB	makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung ≤ 2cm
T3c	IIIC	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung > 2 cm, und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>NX</b>		regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
<b>N0</b>		keine regionären Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>		regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>M1</b>	<b>IV</b>	<b>Fernmetastasen außerhalb der Bauchhöhle (Leberparenchymmetastasen, zytologisch positiver Pleuraerguss, Einbruch in Blase oder Darm)</b>
<b>MX</b>		Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
<b>M0</b>		Keine Fernmetastasen

## 9. Thesen

1. Bestimmte molekularbiologische Marker besitzen eine prognostische Aussagekraft bezüglich des Verlaufs einer Tumorerkrankung. Durch die Untersuchung dieser Biomarker kann versucht werden, die Therapie und die damit verbundene Lebensqualität der Patienten zu optimieren.
2. Die in mehreren Studien nachgewiesene Überexpression von MDMX könnte eine Rolle bei der Tumorentstehung zu spielen.
3. Insgesamt konnten 17 Mutationen (14 %) des MDMX-Gens bei den 118 Ovarialkarzinompatientinnen nachgewiesen werden. Eine erhöhte onkogene Aktivität der Mutationen, besonders im Einzelfall, kann nicht ausgeschlossen werden.
4. Bei den Patientinnen mit dem jeweiligen SNP-Genotyp (C/T- und C/C-Genotyp bei SNP 31112 und A/G- und A/A-Genotyp bei SNP 31274) erkrankten jene Patientinnen mit einem ER-negativen Tumor früher im Gegensatz zu den Patientinnen mit einem ER-positiven Tumor.
5. Patientinnen mit dem jeweiligen SNP-Genotyp (C/T- und C/C-Genotyp bei SNP 31112 und A/G- und A/A-Genotyp bei SNP 31274) und einem ER-negativem Tumor weisen eine längere mittlere Überlebenszeit gegenüber den Patientinnen mit dem jeweiligen SNP-Genotyp und eine ER-positiven Tumor auf.
6. Die untersuchten genetischen Varianten des MDMX-Gens beeinflussen die Tumorentstehung und die Überlebenszeit von Ovarialkarzinompatientinnen. Somit kann diesen SNPs eine prognostische Aussagekraft zugeschrieben werden.

# 10. Anhang

## Tabellarischer Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Nadja Ehrsam, geb. Sbrzesny  
Geburtsdatum/-ort: 01.08.1984 Berlin  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Berufsausbildung

08/13 – heute Elternzeit  
01/11 – 07/13 Assistenzärztin in Weiterbildung für Urologie  
Klinik für Urologie, Vivantes Auguste-Viktoria-Klinikum Berlin  
10/04 – 11/10 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

### Promotion

seit 02/07 Promotionsarbeit im molekularbiologischen Labor des  
Institutes für Pathologie der MLU Halle-Wittenberg  
"Mutationsanalyse des MDMX-Gens beim Ovarialkarzinom"

### Schulbildung

08/97 – 06/04 Besuch der Friedrich-Engels-Oberschule in Berlin  
Reinickendorf  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  
02/01 - 02/02 Auslandsaufenthalt mit Besuch der Humboldt-Schule in San  
José, Costa Rica  
02/96 – 07/97 Besuch der Grundschule an den Buchen in Berlin-Pankow  
08/94 – 02/96 Besuch der Odense-Grundschule in Berlin-Prenzlauer-Berg  
08/91 – 07/94 Besuch der Martin-Niemöller-Grundschule in Berlin-  
Hohenschönhausen

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich, Nadja Ehram, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Das verwendete Schrifttum, sowie die Quellen anderer direkt und indirekt übernommener Daten und Konzepte sind vollständig erwähnt.

Diese Dissertation wurde an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht. Ferner habe ich mich selbst noch um keinen Doktorgrad beworben.

Halle (Saale), den 11.06.2014

Nadja Ehram

## Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die allzeit gute Betreuung und Begleitung bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Bartel und Prof. Steffen Hauptmann bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Ilona Wiederhold für die rege Unterstützung sowie Ute Rolle, Birgit Wypior als auch Anja Böhnke, Anja Wolf, Stefanie Hammer und allen Mitarbeitern des Institutes für Pathologie für die vielen Anregungen und aufbauenden Worte.

Ich möchte mich auch bei Frau Dr. Darmer und Herrn Dr. Christov vom Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung für die Durchführung der Sequenzierreaktionen bedanken.

Für all die aufmunternden und antreibenden Worte gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden.

Die größte Stütze für diese Arbeit war mir jedoch mein Ehemann. Vielen Dank für das stetige, fast schon lästige Antreiben. Ich bin froh, dass du mein Ziel genauso fest vor Augen hattest wie ich und den Weg mit mir gemeinsam gegangen bist. Dafür bin ich dir unendlich dankbar.